Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk

Zakład Mikrobiomiki Roślin

Katarzyna Elżbieta Mikołajczak

Mykobiom endosfery pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) i jego charakterystyka w ujęciu sposobu transmisji grzybów endofitycznych i ich wpływu na reakcje odpornościowe pszenicy

ROZPRAWA DOKTORSKA

W DZIEDZINIE NAUK ROLNICZYCH

W DYSCYPLINIE ROLNICTWO i OGRODNICTWO

Promotor: dr hab. Lidia Błaszczyk, prof. IGR PAN

POZNAŃ 2022

Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem. Stwierdzam, że praca spełnia warunki do przedstawienia w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

…… .....……..……

data dr hab. Lidia Błaszczyk, prof. IGR PAN

Oświadczenie autora pracy

Świadoma odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie pod kierunkiem promotora i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiana praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.

Oświadczam też, że niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

…… .....……..……

data Katarzyna Elżbieta Mikołajczak

Praca została wykonana w ramach projektu:

OPUS14 pt. „Dynamika mykobiomu endosfery pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) i jej wpływ na wzrost i kondycję rośliny”, 2017/27/B/NZ9/01591, kierownik – dr hab. Lidia Błaszczyk, prof. IGR PAN, realizowanego w latach 2018-2022

Niniejszą pracę pragnę zadedykować dwóm
wspaniałym Kobietom: ***mojej Mamie oraz mojej Buni****,*
w podziękowaniu za to kim jestem dziś

Spis tabel

Tabela 1 Stopnie odporności na choroby u odmian pszenicy zwyczajnej wykorzystanych w badaniach (skala 9º)..... 33
Tabela 2 Izolaty grzybów endofitycznych wykorzystane jako inokulum w testach mikrobiologicznych – bikultury. 41
Tabela 3 Izolaty grzybów endofitycznych wykorzystane do inokulacji aksenicznych siewek. 42
Tabela 4 Skład stałego podłoża mikrobiologicznego SNA (ang. Synthetic nutrient-poor agar) [Nirenberg, 1976] 42
Tabela 5 Skład stałego podłoża mikrobiologicznego PDA (ang. Potato Dextrose Agar) 43
Tabela 6 Startery wykorzystane do identyfikacji molekularnej grzybów endofitycznych..... 48
Tabela 7 Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji amplifikacji. 49
Tabela 8 Warunki temperaturowe reakcji amplifikacji 50
Tabela 9 Warunki reakcji enzymatycznego oczyszczania produktów PCR..... 51
Tabela 10 Składniki mieszaniny reakcyjnej do reakcji znakowania 52
Tabela 11 Warunki reakcji znakowania 52
Tabela 12 Startery dla potencjalnych genów referencyjnych oraz badanych genów markerów stresu.55
Tabela 13 Skład mieszaniny reakcyjnej 59
Tabela 14 Warunki reakcji PCR..... 59
Tabela 15 Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji real-time qPCR 60
Tabela 16 Profil temperaturowy zastosowany w reakcji real-time qPCR..... 60
Tabela 17 Identyfikacja szczepów grzybów endofitycznych po inokulacji siewek aksenicznych pszenicy. 102
Tabela 18 Startery wytypowane do reakcji real-time PCR. 103
Tabela 19 Startery wytypowane do reakcji real-time PCR. 105

Spis rycin

Rycina 1 Schemat doświadczeń 35
Rycina 2 Średnie temperatury powietrza [^{o}C] w latach 2018-2019 w Cerekwicy. 38
Rycina 3 Sumy opadów atmosferycznych [mm] w latach 2018-2019 w Cerekwicy. 39
Rycina 4 Schemat przedstawiający fragmenty rośliny wykorzystane do izolacji grzybów endofitycznych. 44
Rycina 5 Izolacja grzybów endofitycznych z wyjałowionych części roślin pszenicy - schemat 45
Rycina 6 Schemat przedstawiający hodowlę grzybów w bikulturach. 53
Rycina 7 Schemat przedstawiający skalę wykorzystaną do jakościowej oceny oddziaływań grzybów 54
Rycina 8 Liczba szczepów grzybów endofitycznych wyizolowana (kolor czerwony) oraz zidentyfikowana (kolor niebieski) u roślin wzrastających w warunkach szklarniowych (generacja G1) i polowych – uprawa ekologiczna oraz tradycyjna. 64
Rycina 9 a - sieć powiązań wspólnych rodzajów/gatunków grzybów endofitycznych występujących w analizowanych systemach uprawy pszenicy; **B** – diagram Venna obrazujący unikalny i wspólny mykobiom endosfery roślin pszenicy dla trzech systemów uprawy. 65
Rycina 10 Sieć powiązań wspólnych rodzajów/gatunków grzybów endofitycznych występujących w badanych odmianach pszenicy zwyczajnej (Triticum aestivum L.) 69
Rycina 11 Sieć powiązań wspólnych rodzajów/gatunków grzybów endofitycznych występujących w badanych odmianach pszenicy uprawianych w warunkach kontrolowanych 73
Rycina 12 Sieć powiązań wspólnych rodzajów/gatunków grzybów endofitycznych występujących w badanych odmianach pszenicy uprawianych w warunkach polowych - uprawa ekologiczna 74
Rycina 13 Sieć powiązań wspólnych rodzajów/gatunków grzybów endofitycznych występujących w badanych odmianach pszenicy uprawianych w warunkach polowych - uprawa tradycyjna 75
Rycina 14 Grzyby endofityczne występujące w każdej z badanych strategii uprawy. 76
Rycina 15 Wskaźniki bioróżnorodności i równomierności dziesięciu odmian pszenicy w badanych systemach uprawy 77
Rycina 16 Sieć powiązań wspólnych rodzajów/gatunków grzybów endofitycznych występujących w poszczególnych organach rośliny. 80
Rycina 17 Sieć powiązań wspólnych rodzajów/gatunków grzybów endofitycznych występujących w poszczególnych organach rośliny uprawianych na polu w systemie ekologicznym (A) i tradycyjnym (B) oraz w warunkach kontrolowanych (C); diagram Venna obrazujący unikalny i wspólny mykobiom poszczególnych organów pszenicy uprawianej na polu w systemie ekologicznym (A') i tradycyjnym (B') oraz w warunkach kontrolowanych (C'). 83
Rycina 18 Grzyby endofityczne występujące w tych samych częściach rośliny w każdej z badanych strategii uprawy. 84
Rycina 19 Wskaźniki bioróżnorodności i równomierności dla poszczególnych organów rośliny (ziarniak, liść, łodyga, korzeń) w badanych systemach uprawy 86
Rycina 20 Wpływ gatunku F. proliferatum, P. album, T. hamatum, T. koningii, P. olsonii, P. expansum, P. crustosum, S. strictum, C. candelabrum, N. gorlenkoana, T. viride na wzrost S. spinificis po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA. 87
Rycina 21 Wpływ gatunku F. proliferatum, P. album, T. hamatum, T. koningii, P. olsonii, P. expansum, P. crustosum, S. spinificis, C. candelabrum, N. gorlenkoana, T. viride na wzrost S. strictum po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA. 88
Rycina 22 Wpływ gatunku F. proliferatum, P. album, T. hamatum, , P. olsonii, P. expansum, P. crustosum, S. spinificis, Sarocladium strictum C. candelabrum, N. gorlenkoana, T. viride na wzrost T. koningii po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA 88

Rycina 23 Wpływ gatunku F. proliferatum, P. album, T. hamatum, P. olsonii, P. expansum, P. crustosum, S. spinificis, Sarocladium strictum C. candelabrum, N. gorlenkoana, T. koningii na wzrost T. viride po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA 89
Rycina 24 Wpływ gatunku F. proliferatum, P. album, T. viride, P. olsonii, P. expansum, P. crustosum, S. spinificis, Sarocladium strictum C. candelabrum, N. gorlenkoana, T. koningii na wzrost T. hamatum po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA..... 90
Rycina 25 Wpływ gatunku T. hamatum, P. album, T. viride, P. olsonii, P. expansum, P. crustosum, S. spinificis, Sarocladium strictum C. candelabrum, N. gorlenkoana, T. koningii na wzrost F. proliferatum po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA..... 91
Rycina 26 Wpływ gatunku T. hamatum, P. album, T. viride, P. olsonii, P. expansum, P. crustosum, S. spinificis, S. strictum C. candelabrum, F. proliferatum, T. koningii na wzrost N. gorlenkoana po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA..... 92
Rycina 27 Wpływ gatunku T. hamatum, N. gorlenkoana, T. viride, P. olsonii, P. expansum, P. crustosum, S. spinificis, Sarocladium strictum C. candelabrum, F. proliferatum, T. koningii na wzrost P. album po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA..... 92
Rycina 28 Wpływ gatunku T. hamatum, N. gorlenkoana, T. viride, P. olsonii, P. expansum, P. crustosum, S. spinificis, Sarocladium strictum, P. album, F. proliferatum, T. koningii na wzrost C. candelabrum po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym 93
Rycina 29 Wpływ gatunku T. hamatum, N. gorlenkoana, T. viride, P. expansum, P. crustosum, S. spinificis, Sarocladium strictum, P. album, F. proliferatum, T. koningii, C. candelabrum na wzrost P. olsonii po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA..... 94
Rycina 30 Wpływ gatunku T. hamatum, N. gorlenkoana, T. viride, P. olsonii, P. crustosum, S. spinificis, Sarocladium strictum, P. album, F. proliferatum, T. koningii, C. candelabrum na wzrost P. expansum po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA. 95
Rycina 31 Wpływ gatunku T. hamatum, N. gorlenkoana, T. viride, P. olsonii, P. expansum, S. spinificis, Sarocladium strictum, P. album, F. proliferatum, T. koningii, C. candelabrum na wzrost P. crustosum po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA. 95
Rycina 32 A. Mykobiom dziesięciu badanych odmian pszenic w generacji G1 oraz G2, **B** diagram Venn'a przedstawiający liczbowo skład mykobiomu w generacji G1 i G2..... 96
Rycina 33 Sieć wspólnych powiązań rodzajów/gatunków grzybów endofitycznych występujących w badanych odmianach pszenicy w generacji G1 (**A**) i G2 (**B**). Krawędzie zaznaczone kolorem różowym wskazują występowanie grzybów z rodzaju Fusarium, a kolorem żółtym grzybów z rodzaju Sarocladium..... 97
Rycina 34 Sieć wzajemnych połączeń przedstawiająca analizę porównawczą mykobiomu w badanych odmianach pszenicy w obu generacjach (G1 oraz G2). 98
Rycina 35 Sieć wzajemnych połączeń przedstawiająca analizę porównawczą mykobiomu w badanych częściach rośliny w obu generacjach: G1 oraz G2 (A) oraz diagram Venn'a przedstawiający liczbowo daną analizę (B)..... 98
Rycina 36 Wskaźniki bioróżnorodności i równomierności w odniesieniu do organów roślin pszenicy w generacji G1 i G2. 99
Rycina 37 Wskaźniki bioróżnorodności i równomierności w odniesieniu do odmian pszenicy w pokoleniu G1 i G2. 100
Rycina 38 Kombinacja genów referencyjnych odpowiednich do normalizacji, zdefiniowana przez normFinder (A), deltaCT (B) BestKeeper (C) oraz Genorm(D). Kolorem zielonym na wykresie zaznaczono najbardziej stabilny gen. 104
Rycina 39 Kombinacja genów referencyjnych odpowiednich do normalizacji. Kolorem zielonym na wykresie zaznaczono najbardziej stabilny gen..... 105
Rycina 40 Porównanie poziomu ekspresji genów HSP70 (kolor czerwony), PR9 (kolor żółty) oraz SOD (kolor zielony) w siewkach badanych odmian pszenicy po 7 dniach od inokulacji F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T. hamatum oraz mieszaniną tych grzybów (MIX). 107

Rycina 41 Porównanie ekspresji genów HSP70 (kolor czerwony), PR9 (kolor żółty) oraz SOD (kolor zielony) w siewkach pszenicy odmiany **Arabella** po 7 dniach od inokulacji F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T.hamatum oraz mieszaniną tych grzybów (MIX). 108
Rycina 42 Porównanie ekspresji genów HSP70 (kolor czerwony), PR9 (kolor żółty) oraz SOD (kolor zielony) w siewkach pszenicy odmiany Arkadia po 7 dniach od inokulacji F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T.hamatum oraz mieszaniną tych grzybów (MIX). 109
Rycina 43 Porównanie ekspresji genów HSP70 (kolor czerwony), PR9(kolor żółty) oraz SOD (kolor zielony) w siewkach pszenicy odmiany Bamberka po 7 dniach od inokulacji F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T.hamatum oraz mieszaniną tych grzybów (MIX). 109
Rycina 44 Porównanie ekspresji genów HSP70 (kolor czerwony), PR9 (kolor żółty) oraz SOD (kolor zielony) w siewkach pszenicy odmiany **Bombona** po 7 dniach od inokulacji F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T.hamatum oraz mieszaniną tych grzybów (MIX). 110
Rycina 45 Porównanie ekspresji genów HSP70 (kolor czerwony), PR9 (kolor żółty) oraz SOD (kolor zielony) w siewkach pszenicy odmiany Euforia po 7 dniach od inokulacji F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T.hamatum oraz mieszaniną tych grzybów (MIX). 111
Rycina 46 Porównanie ekspresji genów HSP70 (kolor czerwony), PR9(kolor żółty) oraz SOD (kolor zielony) w siewkach pszenicy odmiany Kandela po 7 dniach od inokulacji F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T .hamatum oraz mieszaniną tych grzybów (MIX). 111
Rycina 47 Porównanie ekspresji genów HSP70 (kolor czerwony), PR9 (kolor żółty) oraz SOD (kolor zielony) w siewkach pszenicy odmiany Legenda po 7 dniach od inokulacji F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T.hamatum oraz mieszaniną tych grzybów (MIX). 112
Rycina 48 Porównanie ekspresji genów HSP70 (kolor czerwony), PR9 (kolor żółty) oraz SOD (kolor zielony) w siewkach pszenicy odmiany Ostroga po 7 dniach od inokulacji F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T.hamatum oraz mieszaniną tych grzybów (MIX). 112
Rycina 49 Porównanie ekspresji genów HSP70 (kolor czerwony), PR9 (kolor żółty) oraz SOD (kolor zielony) w siewkach pszenicy odmiany **Rospuda** po 7 dniach od inokulacji F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T.hamatum oraz mieszaniną tych grzybów (MIX). 113
Rycina 50 Porównanie ekspresji genów HSP70 (kolor czerwony), PR9 (kolor żółty) oraz SOD (kolor zielony) w siewkach pszenicy odmiany **Rusałka** po 14 dniach od inokulacji F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T.hamatum oraz mieszaniną tych grzybów (MIX). 113

Spis treści

I. WSTĘP 1

1.1. PSZENICA ZWYCZAJNA (*TRITICUM AESTIVUM* L.) 1
1.2. KLASYFIKACJA PSZENICY HEKSAPLOIDALNEJ 1
1.3. EKONOMICZNE ZNACZENIE PSZENICY I CZYNNIKI OGRANICZAJĄCE JEJ PRODUKCJĘ 2
1.4. MIKROBIOM ROŚLIN 5
1.5. ENDOFITY 8
1.5.1. ENDOFITY GRZYBOWE 9
1.5.2. KOLONIZACJA TKANEK 11
1.5.3. SPOSÓB ROZMNAŻANIA I TRANSMISJI GRZYBÓW ENDOFITYCZNYCH 12
1.6. MOLEKULARNE MECHANIZMY INTERAKCJI ROŚLIN Z MIKROORGANIZMAMI 13
1.6.1. ODPORNOŚĆ WRODZONA 14
1.6.2. ODPORNOŚĆ NABYTA 15
1.6.3. SYSTEMY OBRONNE ROŚLIN 17
1.6.4. BIAŁKA PR 17
1.6.5. ŚCIANA KOMÓRKOWA W ODPORNOŚCI ROŚLIN 18
1.6.6. FITOHORMONY W ODPORNOŚCI ROŚLIN 18
1.7. ROLA I ZNACZENIE GRZYBÓW ENDOFITYCZNYCH 20
1.7.1. ZASTOSOWANIE GRZYBÓW ENDOFITYCZNYCH W INTEGROWANEJ OCHRONIE ROŚLIN. 24
1.7.2. BIOLOGICZNA KONTROLA 24
1.8. GRZYBY ENDOFITYCZNE W PSZENICY 27

II. HIPOTEZA 30

III. CEL PRACY 30

IV. MATERIAŁ I METODY 31

4.1. MATERIAŁ ROŚLINNY 31
4.2. METODY 33
4.1.1. PRZYGOTOWANIE ZIARNIAKÓW I WARUNKI WZROSTU ROŚLIN 36
4.2. WARUNKI METEOROLOGICZNE W TRAKCIE PROWADZENIA BADAŃ 38
4.3. ZBIÓR MATERIAŁU ROŚLINNEGO. 40
4.4. PRZYGOTOWANIE INOKULUM I ZASZCZEPIANIE AKSENICZNYCH SIEWEK 41
4.5. IZOLACJA GRZYBÓW Z ENDOSFERY CZĘŚCI NADZIEMNYCH I PODZIEMNYCH ROŚLIN PSZENICY. 43
4.6. IDENTYFIKACJA MOLEKULARNA 46
4.6.1. IZOLACJA GENOMOWEGO DNA 46
4.6.2. REAKCJA AMPLIFIKACJI 47
4.6.3. ELEKTROFOREZA W ŻELU AGAROZOWYM 51
4.6.4. OCZYSZCZANIE ENZYMATYCZNE PRODUKTÓW PCR 51
4.6.5. SEKWENCJONOWANIE PRODUKTÓW AMPLIFIKACJI 51
4.6.6. OCZYSZCZANIE PRODUKTÓW SEKWENCJONOWANIA 52
4.7. HODOWLA IZOLATÓW GRZYBÓW W BI-KULTURACH NA PODŁOŻACH AGAROWYCH 53

4.8. ANALIZA EKSPRESJI GENÓW METODĄ REAL-TIME PCR 54
4.8.1. IZOLACJA RNA 54
4.8.2. OCENA ILOŚCIOWA I JAKOŚCIOWA PREPARATÓW RNA 54
4.8.3. ODWROTNA TRANSKRYPCJA 55
4.8.4. OPTYMALIZACJA REAKCJI AMPLIFIKACJI METODĄ PCR 55
4.8.5. REAKCJA REAL-TIME QPCR 60
4.8.6. ANALIZA STABILNOŚCI GENÓW 61
4.9. ANALIZA DANYCH I WIZUALIZACJA WYNIKÓW 61
4.9.1. ANALIZA CHROMATOGRAMÓW 61
4.9.2. ANALIZA PORÓWNAWCZA SEKWENCJI 61
4.9.3. ANALIZA BIORÓŻNORODNOŚCI 61
4.9.4. ANALIZA WPŁYWU SZCZEPU II NA WZROST SZCZEPU I W TESTACH BIOLOGICZNYCH W BIKULTURACH NA PODŁOŻU PDA 62
4.9.5. WIZUALIZACJA DANYCH I ANALIZA STATYSTYCZNA 63

V. WYNIKI 64

5.1. DOŚWIADCZENIE NR 1 64
5.1.1. KSZTAŁTOWANIE SIĘ STRUKTURY SPOŁECZNOŚCI GRZYBÓW ENDOFITYCZNYCH WYIZOLOWANYCH Z ENDOSFERY ROŚLIN PSZENICY ZDETERMINOWANY JEJ WARUNKAMI UPRAWY. 64
5.1.2 KSZTAŁTOWANIE SIĘ STRUKTURY SPOŁECZNOŚCI GRZYBÓW ENDOFITYCZNYCH WYIZOLOWANYCH Z ENDOSFERY ROŚLIN PSZENICY, ZDETERMINOWANE ODMIANĄ PSZENICY. 67
5.1.3. WSKAŹNIKI BIORÓŻNORODNOŚCI DLA BADANYCH ODMIAN PSZENICY W RÓŻNYCH STRATEGIACH UPRAWY 76
5.1.4. KSZTAŁTOWANIE SIĘ STRUKTURY SPOŁECZNOŚCI GRZYBÓW ENDOFITYCZNYCH WYIZOLOWANYCH Z ROŚLIN PSZENICY, ZDETERMINOWANE ORGANEM ROŚLINNY (ZIARNIAKI, LIŚCIE, ŁODYGI, KORZENIE). 78
5.1.5. WSKAŹNIKI BIORÓŻNORODNOŚCI DLA ORGANÓW ROŚLINNYCH W RÓŻNYCH STRATEGIACH UPRAWY 84
5.2 DOŚWIADCZENIE NR 2 86
5.2.1 OCENA WPŁYWU SZCZEPU II NA WZROST SZCZEPU I - GŁÓWNEGO W TESTACH BIOLOGICZNYCH NA PODŁOŻU LABORATORYJNYM PDA 86
5.3 DOŚWIADCZENIE NR 3 95
5.3.1 STRUKTURA SPOŁECZNOŚCI GRZYBÓW WYIZOLOWANYCH Z ENDOSFERY PSZENICY ZWYCZAJNEJ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) W GENERACJI G1 I G2 96
5.3.2. WSKAŹNIKI BIORÓŻNORODNOŚCI DLA ORGANÓW ROŚLINNYCH W GENERACJI G1 I G2 99
5.3.3. TRANSMISJA POZIOMA 101
5.4. DOŚWIADCZENIE NR 4 103
5.4.1 OPTYMALIZACJA REAKCJI PCR – WYBÓR STARTERÓW 103
5.4.2 OPTYMALIZACJA REAKCJI REAL-TIME PCR DLA GENÓW REFERENCYJNYCH 103
5.4.3 WYBÓR GENÓW REFERENCYJNYCH 104
5.4.4 OPTYMALIZACJA REAKCJI PCR DLA MARKERÓW STRESU 105
5.4.5 OPTYMALIZACJA REAKCJI REAL-TIME PCR DLA WYBRANYCH MARKERÓW STRESU 106
5.4.6 ANALIZA ZMIANY EKSPRESJI WYBRANYCH MARKERÓW STRESU 106

VI DYSKUSJA 114

6.1. SKŁAD GATUNKOWY GRZYBÓW ZASIEDLAJĄCYCH ENDOSFERĘ PSZENICY ZWYCZAJNEJ 115
6.2. WPŁYW ROŚLINY GOSPODARZA NA STRUKTURĘ MYKOBIOMU ENDOSFERY 118
6.3. WPŁYW ORGANU ROŚLINY NA STRUKTURĘ MYKOBIOMU ENDOSFERY 119
6.4. WPŁYW STRATEGII I WARUNKÓW UPRAWY NA STRUKTURĘ MYKOBIOMU ENDOSFERY 123
6.5. TRANSMISJA WERTYKALNA I HORYZONTALNA 125
6.6. ZNACZENIE GATUNKÓW GRZYBÓW ENDOFITYCZNYCH 127
6.7. WPŁYW GRZYBÓW ENDOFITYCZNYCH NA REAKCJE ODPORNOŚCIOWE PSZENICY. 131
6.8. ANALIZA WSPÓŁODDZIAŁYWAŃ GRZYBÓW ENDOFITYCZNYCH WYIZOLOWANYCH Z TKANEK PSZENICY 136
6.9. WYKORZYSTANIE ENDOFITÓW JAKO POTENCJALNYCH CZYNNIKÓW BIOKONTROLI 138

VII PODSUMOWANIE 143

VIII WNIOSKI 149

IX STRESZCZENIE 153

X ABSTRACT 155

XI BIBLIOGRAFIA 157

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

CSA	*Climate smart agriculture*	Inteligentne rolnictwo klimatyczne
FAO	*Food and Agriculture Organization of the United Nations*	Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa
ABA	*Abscisic acid*	Kwas abscysynowy
AM	*arbuscular mycorrhizal*	Mykoryza arbuskularna
DSE	*Dark separate endophytes*	
ROS		Reaktywne formy tlenu
CSP	*common symbiotic pathway*	wspólnym szlakiem symbiotycznym
PAMP	*pathogen-associated molecular patterns*	Wzorce molekularne związane z patogenami
PR	*pathogenesis-related protein*	Białko związane z patogenezą
HR	*hypertensive response*	Reakcja nadwrażliwości
ROS	*reactive oxygen species*	Reaktywne formy tlenu
LAR	*local acquired resistance*	Lokalna odpowiedź nabywa
SAR	*systemic acquired resistance*	Systemiczna odporność nabyta
ISR	*induced systemic resistance*	Systemiczna odporność indukowana
SA	*Salicylic acid*	Kwas salicylowy
MAMP	*microbe-associated molecular patterns*	Wzorce molekularne związane z mikroorganizmami
MeSA		metylosalicylan
PRR	*pattern recognition receptors*	receptory rozpoznawania wzorców
MTI	*MAMP-triggered immunity*	Odporność wyzwalana przez MAMP
ETI	*effector-triggered immunity*	Odporność wyzwalana przez efektory
JA	*Jasmonic acid*	Kwas jasmonowy
ET	*ethylen*	etylen
SOD	*superoxide dismutase*	Dysmutaza ponadtlenkowa
CAT	*catalase*	katalaza
APX	*ascorbate- or thiol-dependent peroxidase*	peroksydaz zależnych od askorbinianu lub tiolu
GR	*glutathione reductase*	reduktazy glutationowej
DHAR	*dehydroascorbate reductase*	reduktazy dehydroaskorbinianowe
MDHR	*mono-dehydroascorbate reductase*	reduktazy mondehydroaskorbinianowe
IPM	*integrated pest management*	Zintegrowana ochrona roślin
BCA	*Biological control agent*	Środki kontroli biologicznej
IAA	*Indole-3-acetic acid*	Kwas indolilo-3-octowy

I. WSTĘP

1.1. Pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum* L.)

Pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum* L.) jest podstawowym i ważnym zbożem, zajmującym czołowe miejsce obok kukurydzy i ryżu, których uprawy łącznie stanowią około połowy całkowitej światowej produkcji żywności. Służy nie tylko do wypieku chleba, ale także do wyrobu ciast, makaronów, płatków śniadaniowych i produktów fermentowanych. Staje się również popularna jako roślina pastewna. Od kilkunastu lat słoma pszenna jest wykorzystywana jako materiał paszowy oraz do produkcji etanolu. Jako zboże wykorzystywane do produkcji chleba, towarzyszy człowiekowi od dawna. Źródła podają, że pierwsze wzmianki o uprawie pszenicy datowane są na rok ok. 7000 p.n.e. i pochodzą z wykopalisk archeologicznych na Bliskim Wschodzie [Feldman, 1976]. W Europie pojawiła się w epoce neolitu (około 5000 lat p.n.e.) w starożytnym Rzymie i Grecji. Pierwsze ślady występowania pszenicy na terenach dzisiejszej Polski datowane są na rok 1000-2000 p.n.e., o czym świadczy obecność śladów pszenicy płaskurki (*Triticum dicoccon* Schubl.) w jaskiniach na terenie Ojcowskiego Parku Narodowego.

1.2. Klasyfikacja pszenicy heksaploidalnej

Pod względem botanicznym pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum* L.) należy do podrodziny *Pooideae*, rodziny P*oaceae*. Do tej rodziny należą między innymi podrodziny *Bambusoideae* obejmujące ryż (*Oryza sativa*) i *Panicoideae* obejmujące kukurydzę (*Zea mays*). w obrębie podrodziny *Pooideae* pszenica należy do superplemienia *Triticodeae* i do plemienia *Triticeae*. Plemię *Triticeae* obejmuje trzy ważne podplemiona: *Triticineae* z gatunkami *Triticum* i *Aegilops*, *Secalineae* z żytem (*Secale cereale*) i *Hordineae* z jęczmieniem (*Hordeum vulgare*). Ponad dwa tuziny pojedynczych gatunków zostały scharakteryzowane jako członkowie rodzaju *Triticum*, wśród których tylko T. *monococcum* L., T. *turgidum* L. i T. *aestivum* L. są powszechnie uprawiane.

Heksaploidalna pszenica chlebowa (*Triticum aestivum* L. 2n = 6x = 42) jest gatunkiem allopoliploidalnym, który powstał w uprawie 8000 lat temu w wyniku hybrydyzacji, po której nastąpiło spontaniczne podwojenie chromosomów, pomiędzy T. *turgidum* ssp. *dicoccum* i diploidalną trawą *Aegilops tauschii* ssp. (2n= 6x =14, genom DD; [McFadden i Sears, 1946; Jaaska, 1980]. Wczesne badania cytogenetyczne sugerowały, że genomy A poliploidów zostały wniesione przez T. *monococcum* [Sax, 1922; Lilienfeld i Kihara, 1934], tymczasem nowsze badania udokumentowały, że dawcą genomu A jest T. *urartu* [Natarajan i Sharma, 1974; Huang i in, 2002]. Pochodzenie genomu B pozostaje niepewne i kontrowersyjne [Kerby

i in.; 1988]. Pierwotnie uważano, że genom B pochodzi od *Aegilops speltoides* [Sarkar i Stebbins, 1956]. Feldman [1979] zaproponował *Triticum longissimum* i *Triticum searsii* jako przodków genomu B. Nath i in. [1983] doszli do wniosku, że T. *searsii* było możliwym źródłem genomu B po zbadaniu kilku prawdopodobnych przodków. Obecnie uważa się, że pierwotny dawca genomu B pszenicy nie występuje już w środowisku, ale był prawdopodobnie członkiem sekcji *Sitopsis* pszenżyta spokrewnionej z *Aegilops speltoides* [(Feuillet i in.; 2007].

1.3. Ekonomiczne znaczenie pszenicy i czynniki ograniczające jej produkcję

W przeciwieństwie do ryżu i kukurydzy, które preferują wyższe temperatury, większość odmian pszenicy jest przystosowana do wzrostu w umiarkowanym klimacie [(Gupta i in., 2008]. Według FAO [FAOSTAT, 2021] pszenica zajmuje około 20% powierzchni upraw (w 2020 roku wynosiła 219 mln ha, natomiast ryżu i kukurydzy odpowiednio 164 mln ha i 202 mln ha), a jej roczna produkcja wynosi 761 mln ton ziarna. W Unii Europejskiej powierzchnię gruntów wykorzystana na uprawę pszenicy w 2020 roku oszacowano na 22,9 mln ha, a w Polsce na 2,4 mln ha; roczna produkcja wynosiła odpowiednio 126,7 mln ton i 12,4 mln ton ziarna.

Rolnictwo staje przed wyzwaniem, aby do 2050 roku zwiększyć produkcję żywności o około 50% ze względu na wzrost światowej populacji i zmianę diety [FAOSTAT, 2021]. Jako że pszenica to jedna z podstawowych roślin dostarczająca 20% kalorii i białka w żywieniu człowieka [Tilman i in., 2011], jej produkcja również powinna wzrosnąć, by zapewnić prognozowane zapotrzebowanie na żywność. Wzrost ten powinien opierać się głównie na wzroście plonów, ponieważ istnieje silna konkurencja o rzadkie grunty orne ze strony innych sektorów gospodarczych [FAOSTAT, 2021]. Przyszłe zapotrzebowanie będzie musiało zostać zaspokojone poprzez zrównoważony wzrost produkcji łączący zintegrowane zarządzanie chorobami i szkodnikami, przy zwiększonej częstotliwości występowania stresów abiotycznych, zmian klimatu, przy ograniczonej dostępności wody i innych zasobów niezbędnych do funkcjonowania rośliny.

Ogromny wpływ na produkcję pszenicy ma środowisko, w którym rozwijają się rośliny. Czynniki środowiskowe wpływające na wielkość plonu można podzielić na biotyczne i abiotyczne. Stresy abiotyczne obejmują m.in. suszę, ale też zbyt duże opady deszczu, pH gleby czy zasolenie, niedobór lub nadmiar składników odżywczych oraz mikro- i makroelementów.

Susza odnosi się do sytuacji, w której ilość wody dostępnej w wyniku opadów i/lub nawadniania jest niewystarczająca do zaspokojenia potrzeb uprawy w zakresie ewapotranspiracji [Kumaraswamy i Shetty, 2016]. Zmiany klimatu wpływają na wzrost stresów abiotycznych, takich jak dostępność wody, prowadząc do suszy, zwiększonej częstości występowania chorób i szkodników oraz ekstremalnych zjawisk pogodowych w skali lokalnej i regionalnej [Kumaraswamy i Shetty, 2016]. Stres spowodowany wilgocią lub suszą odpowiada za około 30–70% utraty produktywności upraw polowych w okresie wegetacji roślin [Kumaraswamy i Shetty, 2016]. Stres suszy może indukować gromadzenie się kwasu abscysynowego (ABA) w komórkach ochronnych, co powoduje zamknięcie aparatów szparkowych [Li i Cui, 2014]. Susza powoduje również nieprawidłowy metabolizm, który może spowolnić wzrost roślin i/lub spowodować obumarcie całej rośliny. Susza ma różne skutki na różnych etapach wzrostu roślin, przy czym najbardziej wrażliwym etapem jest okres kwitnienia. Wysoka temperatura wpływa na procent kiełkowania nasion, wydajność fotosyntezy, czas kwitnienia, żywotność pyłku [Kumaraswamy i Shetty, 2016; Antle i McGuckin, 1993]. Pod wpływem stresu cieplnego dochodzi do zahamowania pęcznienia ziaren pyłku, co skutkuje słabym uwalnianiem pyłku z pylników w fazie pękania. Stres cieplny może przyczyniać się do około 40% całkowitej utraty plonów pszenicy [Elbasyoni, 2018]. Żyzność gleby jest jednym z ważnych czynników produkcji roślinnej, ponieważ jest głównym źródłem mikroelementów (Fe, B, Cl, Mn, Zn, Cu, Mo, Ni) i makroelementów (N, P, K, Ca, S, Mg, C , O, H), które są potrzebne do wzrostu roślin. Brak tych składników pokarmowych w glebie powoduje niedobory u roślin, a ich nadmiar prowadzi do toksyczności, która ma negatywny wpływ na plony. Intensywna produkcja rolnicza charakteryzująca się nadmiernym stosowaniem nawozów i chemikaliów bez przestrzegania zasad zrównoważonego rozwoju rolnictwa prowadzi do pogorszenia stanu gleby, jej degradacji i poważnych problemów środowiskowych [Shah i Wu, 2019]. Stres związany z zasoleniem jest jednym z głównych problemów wpływających na produkcję roślinną na całym świecie, a szacuje się, że około 20% gruntów uprawnych i 33% gruntów nawadnianych jest zasolonych [Machado i Serralheido, 2017]. Sól powoduje stres osmotyczny u roślin uprawnych. W normalnych warunkach wyższe ciśnienie osmotyczne w komórkach roślinnych umożliwia wchłanianie wody i niezbędnych składników odżywczych z roztworu glebowego do komórek korzeniowych. Jednak wysokie stężenie soli w roztworze glebowym uniemożliwia wchłanianie wody i niezbędnych składników mineralnych, ale ułatwia wnikanie jonów Na^+ i Cl^- do komórek, co prowadzi do toksycznego wpływu na błony komórkowe, jak również na aktywność metaboliczną w cytozolu [Kumar, 2013]. W wyniku uwalniania zakwaszających jonów glinu, żelaza i manganu,

wypłukiwania jonów zasadowych, takich jak wapń, magnez, potas i sód, rozkładu materii organicznej gleby i regeneracji kwasów organicznych, nitryfikacji nawozów amoniakalnych [Heggeenstaller, 2012; Johnson i Lincoln, 2000] oraz praktyki gospodarowania gruntami, obniża się pH gleby [Tandzi i in., 2018].

Choroby roślin są wywoływane przez różne mikroorganizmy, takie jak wirusy, bakterie i grzyby. Ponadto na produkcję roślinną wpływają również szkodniki bytujące w glebie i na jej powierzchni. Namnażaniu się patogenów często sprzyjają często zmieniające się warunki klimatyczne, jednocześnie negatywnie wpływając na produktywność roślin i żyzność gleby, a przez to zmniejszenie dostępnych zasobów dla roślin, skutkując zmniejszeniem plonowania. Zmieniający się klimat przyczynia się do migracji patogenów i szkodników. W ten sposób lokalnie przystosowane genotypy roślin uprawnych konfrontują się z nowymi biotycznymi czynnikami stresowymi.

Najczęstszymi chorobami grzybowymi odnotowanych u pszenicy, są choroby, takie jak rdza brunatna liści wywoływana przez *Pucinia triticina*, fuzarioza kłosów wywoływana obecnością grzybów z rodzaju *Fusarium*, głównie *F. graminearum,* brunatna plamistość liści powodowana przez P. *striformis tritici* i mączniak prawdziwy wywoływany przez *Blumeria graminis* [Gaju i in., 2014]. Wśród chorób odwirusowych wyróżnia się wirus mozaiki pszenicy, wirus żółtej mozaiki pszenicy i wirus mozaiki wrzecionowatości pszenicy. Wirus mozaiki pszenicy bytujący w glebie spowodował w USA straty plonu na poziomie 50%. Objawami choroby jest zahamowanie wzrostu rośliny oraz słabo rozwinięty system korzeniowy, a w późniejszym czasie pojawienie się żółtej mozaiki na liściach. Natomiast wirus mozaiki wrzecionowatości pszenicy może powodować do 30% straty plonów pszenicy ozimej. Zaburza wzrost roślin i kształtowanie się nasion [Perovic i in., 2009; Segundo i in., 2007]. Wśród szkodników odnotowuje się nicienie, ich młode osobniki drugiego stadium wnikają do korzeni i przemieszczają się w kierunku układu naczyniowego. Nicienie poprzez swój wzrost i rozwój rozwijają syncytie, które pobierają pokarm i składniki odżywcze z pobliskich komórek, osłabiając tym samym pszenicę [Kumar i inni, 2018]. W celu zapobiegania negatywnym skutkom wyżej wymienionych stresów nastąpił rozwój innowacyjnych technologii w rolnictwie, takich jak odmiany odporne, poprawa praktyk agronomicznych i zarządzania (zintegrowane zarządzanie składnikami odżywczymi i pestycydami), udoskonalenie maszyn rolniczych [Kumaraswamy, 2016].

Nowym programem badawczym jest tzw. Inteligentne rolnictwo klimatyczne (CSA – ang. *Climate smart agriculture*) powszechnie akceptowane jako najlepsze podejście do radzenia sobie ze skutkami zmian klimatu w rolnictwie. CSA promuje transformację systemów rolniczych i wymaga transformacji polityki rolnej w celu zwiększenia produkcji żywności, zwiększenia bezpieczeństwa żywnościowego, zapewnienia przystępności cenowej żywności (niski koszt nakładów), przy jednoczesnym zapewnieniu zrównoważonego zarządzania zasobami naturalnymi i odporności roślin na zmieniający się klimat.

Na podstawie wyników symulacji plonów i prognozy pogody, rolnicy mogą zmienić termin sadzenia roślin, zastosować odpowiednie genotypy roślin, dostosować cykle nawożenia i nawadniania tak, aby uzyskać satysfakcjonujące plony, zmniejszając tym samym ryzyko wystąpienia nieoczekiwanych zdarzeń [Tandzi i Mutengwa, 2019]. Poprawa wydajności nawadniania i gospodarki wodnej ma kluczowe znaczenie dla zapewnienia dostępności wody zarówno do produkcji żywności, jak i do zaspokojenia konkurencyjnych potrzeb ludzi i środowiska. Aby poprawić produktywność i trwałość upraw, bardzo ważna jest ocena wpływu działalności człowieka na żyzność gleby poprzez stosowanie odpowiednich systemów rolniczych, takich jak uprawa roli, stosowanie zalecanych dawek i typów nawozów, wprowadzanie obornika i/lub resztek pożniwnych do gleby (zwiększenie podaży N, P, K i innych składników pokarmowych) oraz unikanie nawadniania osadami ściekowymi. Stosowanie tych nakładów długoterminowo poprawia właściwości fizyczne gleby lub glebowej materii organicznej i zapewnia zrównoważone rolnictwo.

1.4. Mikrobiom roślin

Pierwsze interakcje roślin z mikroorganizmami datowane są na 400 mln lat temu. Istnieją dowody kopalne, które wskazują na nawiązanie interakcji pomiędzy roślinami a grzybami – mikoryza arbuskularna [Krings i in., 2007]. Pojawienie się roślin i nawiązanie z nimi oddziaływań umożliwiło mikroorganizmom kolonizację wewnętrznych tkanek korzeni, liści i łodyg [Upson i in., 2018]. W ten sposób wykształciły się symbiotyczne, ale też komensalne asocjacje. Obecnie zdecydowana większość mikroorganizmów wykazuje neutralny charakter interakcji w roślinami [Morgan i in., 2005], a inne wpływają negatywnie na rozwój rośliny gospodarza [Zhang i in., 2010; Tian i in., 2020].

W przeciwieństwie do patogenów, istnieją również mikroorganizmy, które rozwijają się razem z roślinami, czerpiąc obopólne korzyści z tego połączenia; roślina wytwarza związki w procesie fotosyntezy, podczas gdy heterotroficzne mikroorganizmy zapewniają ochronę przed patogenami, stymulują wzrost poprzez syntezę i sekrecję związków o różnym

pochodzeniu i funkcji [Arif i in., 2020; Bakker i in., 2020; Hassan i in., 2019; Haney i in., 2015]. Przykładem mogą być grzyby z rodzaju *Trichoderma*, które poprzez zdolność do syntezy związków pełnią fundamentalną rolę w interakcji z roślinami, czy to poprzez stymulowanie ich wzrostu czy jako antagoniści grzybów patogennych lub nicieni [Santoyo i in., 2021; Méndez-Santiago i in., 2021]. Również grzyby mikoryzowe, które bytują w korzeniach, i są związane z cyklami biogeochemicznymi, poprawiają warunki żyzności gleby, a tym samym poprawiają stan odżywienia rośliny [Bona i in., 2017]. Bardzo szybko znaleziono zastosowanie tej mikrobioty związanej z roślinami o korzystnych zdolnościach metabolicznych. Została wykorzystana jako bioinokulanty (tj biofungicydy/bionawozy lub oba) do poprawy wzrostu i produkcji zbóż, warzyw i owoców w różnych systemach rolniczych [Sarma i in., 2015; Díaz-Rodríguez i in., 2021; Orozco-Mosqueda i in., 2021]. Stanowią więc doskonały zamiennik stosowanych agrochemikaliów, które zanieczyszczają środowisko i są toksyczne dla zdrowia człowieka [Walters i in., 2014; Adesemoye i in., 2009].

Rodzaj interakcji między rośliną a jej mikrobiomem może ulec zmianie, od stanu neutralnego lub komensalnego do patogennego. Newton i in. [2010] podkreślają że warunki środowiskowe, w których bytuje roślina gospodarz mogą wpływać na zmiany wymagań troficznych mikroorganizmu od patogenicznego w mutualistyczny i odwrotnie, przekształcić organizm mutualistyczny w pasożyta lub patogena. Część mikroorganizmów występujących w środowisku może wchodzić w krótkotrwałe interakcje z roślinami. Inne mikroorganizmy wchodzą w długotrwałe interakcje i mikroorganizmy te nazywamy *core microbiome* [Lemanceau i in., 2017; Massoni i in., 2020], czyli te, które bytują i rozwijają się w różnych organach roślinnych takich jak korzenie, liście, nasiona i związane są z rośliną, a ich interakcje nie ulegają zmianie niezależnie od czynników zewnętrznych [Arif i in., 2020; Orozco-Mosqueda i in., 2018; Hanin i in., 2016; Liu i in., 2019]. Czynniki biotyczne i abiotyczne mają wpływ na długość i charakter interakcji roślin z mikrobiomem [Qu i in, 2020]. Do najważniejszych czynników abiotycznych należą pH gleby, dostępność składników odżywczych, tlen, temperatura, woda, występowanie metali ciężkich, zasolenie, temperatura [Fierer i Jackson, 2006; Zarraonaindia i in., 2015].Skład mikrobiomu determinuje również organ roślinny (korzenia, łodyga, liście) oraz etapu rozwoju.

Rośliny jako organizmy statyczne, uzależnione są od interakcji z otaczającymi je organizmami [Zhu, 2016], dopiero potomstwo niektórych roślin może nawiązać nowe interakcje z mikrobiotą występującą w glebie czy otaczającym je środowisku przy pomocy nasion, które mogą zostać przeniesione na duże odległości [Wright i in., 2008]. Jednak, gdy nasiona wykiełkują, wchodzą

w interakcje z mikrobiotą występującą w glebie poprzez korzenie [Compant i in., 2010]. Organy naziemne roślin są również podatne na kolonizację przez mikroorganizmy przenoszone przez wiatr, ptaki czy owady [Schlechter i in., 2019]. Mikroorganizmy zasiedlające ryzosferę, takie jak bakterie, grzyby czy wirusy, jak również nicienie i owady [Hartmann i in., 2008] mogą wchodzić w interakcje z rośliną poprzez korzenie. Część z nich definiowana jako endofity migruje w tkankach nadziemnych, często do nasion i jest przenoszona wertykalnie do kolejnych pokoleń roślin. Korzenie roślin wchodzą w interakcje z mikrobiotą glebową, wydzielając substancje takie jak aminokwasy, cukry, witaminy, kwasy tłuszczowe [Vives-Peris i in., 2020]. Wykazano, że niektóre substancje jak flawonoidy, cytryniany, kamaleksyna, zaangażowane są w selektywną rekrutację taksonów mikroorganizmów [Arif i in., 2020]. W warunkach stresu, na przykład w obecności fosforanów czy ograniczonym źródle żelaza, niektóre rośliny zwiększają sekrecję cytrynianów czy szczawianów, w ten sposób wzbogacając ryzosferę w węgiel organiczny, będący atraktantem dla roślin [Vives-Peris i in., 2020]. Rośliny strączkowe wydzielają związki fenolowe, takie jak flawonoidy i izoflawonoidy, które zwiększają ekspresję genów nodulacji (nod) w symbiotycznych bakteriach wiążących azot, znanych jako rhizobia. W odpowiedzi ryzobia wytwarza czynniki nod będące oligosacharydami, których funkcją jest indukowanie szeregu zmian fizjologicznych w korzeniu rośliny, aby następnie utworzyć guzki wiążące azot. Kilka przykładów tego typu symbiotycznych i niezwykle specyficznych interakcji to *Rhizobium spp*. które są symbiontami *Phaseolus spp*. (np. fasola zwyczajna), *Sinorhizobium spp*. gatunków *Medicago* (np. lucerna), *Mesorhizobium spp*. *Lotus spp.* (np. lotos, ciecierzyca) i *Bradyrhizobium spp.* glicyny spp. (np. soja) [Abd-Alla i in., 2014; Li i in., 2020; Lopez-Gomez i in., 2012; Peralta i in., 2004]. Endosymbioza ryzobii w obrębie korzeni roślin sugeruje wspólny szlak sygnałowy w roślinach dla grzybów (np. mikoryzowych grzybów arbuskularnych) i symbiotycznych proteobakterii, który został nazwany wspólnym szlakiem symbiotycznym (ang. *common symbiotic pathway*, CSP) [Genre i Russo, 2016; Genre i in., 2020]. Badania z wykorzystaniem ryżu sugerują, że roślina ta reaguje na endofityczną kolonizację *Azoarcus sp*., indukując zmiany metaboliczne i sygnalizację zależną od Ca^{2+}, bez CSP [Chen i in., 2015]. To dodatkowo podkreśla specyficzność rozpoznawania i nawiązywania interakcji roślin-endofitów. Liu i in. [2019] zaobserwowali, że genotyp roślin soi (*Glycine max*) jest ważny w budowaniu mikrobiomu ryzosfery. Bez względu na rodzaj gleby stwierdzono obecność określonych rodzajów bakterii, takich jak *Rhizobium, Novosphingobium, Phenylobacterium, Streptomyces i Nocardioides*. W badaniach Micallefa i in. [2009] zasugerowano, że wiek i genotyp rośliny wpływają na sukcesywną progresję zbiorowiska bakterii ryzosferycznych w roślinach modelowych, takich

jak *Arabidopsis thaliana*. Natomiast Bakker i in. [2015] zaobserwowali, że skład mikrobiomu zależy nie tylko od substancji wydzielanych przez roślinę, ale też od rodzaju gleby. W zależności od typu gleby, może powstać specyficzny mikrobiom ryzosferyczny (wraz z mikrobiomem nasion) [Kong i in., 2019; Zarraonaindia i in., 2015; (Girsowicz i Steinberger, 2019; Ramakrishnan i in., 2017]. Zdolność rośliny do rekrutacji związanego z nią mikrobiomu może być ograniczona przez natywną mikrobiotę glebową.

1.5. Endofity

Dla mikroorganizmów, których wspólną cechą jest bytowanie w roślinie gospodarzu wypracowano kilka definicji. Termin endofit pochodzi od greckiego słowa „w roślinie" [Siegel i in., 1987] Prawdopodobnie to mykolog Thomas de Bary jako pierwszy zasugerował ten termin endofit [Kusari i in., 2012]. Początkowo zaproponowano, aby endofitem określać organizmy bytujące w roślinie przez cały swój cykl życiowy (włączając w ten sposób mikoryzy) i nie wywołujące symptomów chorobowych przynajmniej przez część swojego życia w roślinie, a tym samym obejmując wiele patogenów roślin. Ponadto zasugerowano, że endofity są nie tylko mutualistami, ponieważ ten sam mikroorganizm uznawany za mutualistę w roślinie może wykazywać właściwości antagonistyczne, co zaobserwowano w przypadku niektórych endofitów buławinkowych (*clavicipitaceous*). Wilson [Wilson, 1995] był zdania, że patogeny mogą być uznane za endofity, chyba że natychmiast wywołują objawy chorobowe. Kontrastuje to z Wennströmem [Wennström, 1994], który podkreślał, że patogeny takie jak grzyby z rodzaju *Puccinia* wywołujące rdzę zbóż i *Ustilago maydis* wywołujące głownię kukurydzy nie powinny być klasyfikowane jako endofity. Wilson [1995] argumentował również, że sam fakt, że organizm został wyizolowany z tkanki wyglądającej na zdrową, nie oznacza, że nie jest patogenem.

Jedną z cech kwalifikujących endofity jest ich lokalizacja. Według Saikkonen i in. [Saikkonen i in., 1998] endofity bytują głównie w liściach i sporadycznie występują w korzeniach. Podobnie jak Wilson [1995] zaproponowali, aby grzyby mykoryzowe, takie jak arbuskularne grzyby mykoryzowe (AM) lub ektomykoryzy nie mogły być uważane za endofity, ponieważ ich strzępki rozciągają się poza korzenie. Wśród grzybów bytujących w korzeniach są *dark separate endophytes* (DSE) [Addy i in., 2005]. Busby i in. [2015] wspomnieli, że niektóre epifity występują również jako endofity. Ta klasyfikacja dotycząca lokalizacji przestrzennej nie zawsze pomaga w zdefiniowaniu endofitu. Innym kryterium definicji endofitu są domeny taksonomiczne.

Niektóre definicje ograniczają termin „endofity” do grzybów [Carroll, 1988], podczas gdy inne uznają bakterie za endofity, które znajdują się w roślinie i tworzą z nią bądź interakcję symbiotyczną lub neutralną z jakąkolwiek interakcją symbiotyczną lub bez niej [Hallmann i in., 1997].

Sposób wykrywania endofitów ma również wpływ na ich definicję. Opisywanie endofitów jako „bakterii i grzybów, które można wykryć w określonym momencie w tkankach pozornie zdrowych roślin żywicielskich” [Schulz i Boyle, 2006]. Definicja endofitu na podstawie sposobu ich wykrywania wyklucza mikroorganizmy, których nie można wyizolować z tkanek roślinnych.

Znaczącą rolę w próbach zdefiniowania endofitów odegrało przejście od lokalizacji mikroorganizmu i jego wykrywania do związku z żywicielem [Wennström, 1994; Wilson, 1995]. Schulz i in. [Schulz i in., 1999] uważali, że endofity istnieją w stanie „zrównoważonego antagonizmu” z żywicielem, w którym endofit różni się od patogenu tym, że ten pierwszy nie może pokonać mechanizmów obronnych żywiciela. Kogel i in. [2006] mieli podobny pogląd, przy czym ich zdaniem „równowaga” była związana z reakcją i produkcją reaktywnych form tlenu (ROS) przez endofit lub roślinę. Photita i in. [2004] stwierdzili, że niektóre endofity są utajonymi patogenami roślin, tj. ostatecznie pokonują mechanizmy obronne żywiciela roślinnego, potwierdzając argument Wilsona [1995], że nawet patogeny można uznać za endofity na pewnym etapie ich cyklu życiowego.

Najszersze definicje endofitów klasyfikują je jako organizmy, które aktywnie kolonizują wnętrze rośliny, rozprzestrzeniają się i rozmnażają w niej [van Overbeek i in, 2006]. Sikora i in. [2007] opisali endofity jako „wszelkie organizmy żyjące w tkance roślinnej, obojętne, korzystne lub szkodliwe”. Te dwie ostatnie definicje wyczerpująco klasyfikują wszystkie organizmy, które spędzają w żywej tkance roślinnej część lub całość swojego cyklu życiowego.

1.5.1. Endofity grzybowe

Termin „endofit grzybowy” może odnosić się szeregu taksonów grzybów. Niektóre wysoce przystosowane symbionty traw są członkami *Clavicipitaceae* [Clay, 1990]; te endofity są postrzegane za najczęściej badane ze wszystkich mikroorganizmów, które wykazują pożyteczne oddziaływanie z rośliną żywicielską [Anand i in., 2006]. Inna grupa grzybów, *dark separate endophytes* (DSE), jest uważana za najliczniejszą [Sieber i Grünig, 2006]. DSE często należą do *Ascomycota*, są zróżnicowane taksonomicznie i mogą obejmować gatunki

ektomikoryzowe [Jumpponen, 2001; Addy i in., 2005], a grzyby ektomikoryzowe mogą należeć do *Basidiomycota, Ascomycota i Zygomycota* [Tedersoo i in., 2010].

Uważa się, że endofity grzybowe występują w prawie wszystkich roślinach lądowych i wodnych [Stone i in., 2000], a nawet w wodorostach [Suryanarayanan, 2012]. Hardoim i in. [2015] omówili ich obecność w trawach, roślinach dwuliściennych, porostach, mchach i paprociach oraz korze drzew.

Opracowano kilka systemów kategoryzowania grzybów endofitycznych. Nomenklatura służąca do klasyfikacji endofitów grzybowych opracowana przez Carrol [1988] zdefiniowała endofity typu I i II jako, odpowiednio konstytutywne i indukowalne [(Yuan i in., 2010]. Rodriguez i in. [2009] opisali endofity typu I jako endofity układowe, zwykle należące do rodziny *Clavicipitaceae*, przenoszone przez nasiona, a endofity typu II jako należące do szerokiej gamy organizmów przenoszonych poziomo [Yuan, 2009]. Transmisja pozioma ma miejsce, gdy endofity są przenoszone ze środowiska, w tym z innych roślin, na roślinę żywicielską [Chung i Schardl, 1997]; podczas gdy przenoszenie z rodzica na potomstwo przez nasiona jest określane jako przenoszenie pionowe [Afkhami i Rudgers, 2008]. Sposób, w jaki grzyb endofit dociera do żywiciela, był jednym kryteriów wykorzystanych przez Rodrigueza i in. [2009] do opracowania systemu ich klasyfikacji. Według tych autorów endofity *Clavicipitaceae* i endofity *Non-Clavicipitaceae* można podzielić na cztery klasy w oparciu o zestaw kryteriów obejmujący zakres rośliny gospodarza, skolonizowane tkanki, stopień kolonizacji i różnorodności, sposób przenoszenia i korzyści związane z przystosowaniem nadane gospodarzowi. Endofity klasy 1 obejmują gatunki *Clavicipitaceae*, które mają wąski zakres żywicieli; potrafią intensywnie kolonizować pędy i kłącza; są przenoszone pionowo i poziomo oraz przynoszą żywicielowi korzyści niezwiązane z siedliskiem. Wszystkie endofity klasy 2, 3 i 4 to endofity *Non- Clavicipitaceae* i mają szeroki zakres żywicieli. Endofity klasy 2 mają zdolność do kolonizacji pędów, korzeni i kłączy, mają niską różnorodność biologiczną, są przenoszone pionowo i poziomo i zapewniają roślinie gospodarzowi zarówno korzyści związane jak i niezwiązane z siedliskiem. Endofity klasy 3 kolonizują pędy tylko w ograniczonym stopniu, i mają szeroki zakres żywicieli. Są przenoszone poziomo, przynosząc żywicielowi korzyści niezwiązane z adaptacją do siedliska. Endofity klasy 4 obszernie kolonizują korzenie i mają szeroki zakres żywicieli Są przenoszone poziomo i podobnie jak endofity klasy 3 przynoszą żywicielowi korzyści nieuwarunkowane z siedliskiem.

Według Rodrigueza i in. [2009] endofity grzybów należące do tego samego rodzaju mogą różnić się kategoryzacją, np. gatunek *Epichloë* może należeć do typu I lub II. Te endofity mogą kontrolować sposób ich przenoszenia, a w niektórych przypadkach mogą kontrolować rozwój roślin poprzez produkcję hormonów roślinnych, w tym auksyn. Backman i Sikora [2008] ogólnie podzielili endofity na trzy grupy: patogeny innych roślin żywicielskich, które są nieszkodliwe jako endofity; niepatogenne mikroorganizmy; lub zmodyfikowane patogeny, które utraciły swoją patogenność, ale nie zdolność do kolonizacji żywiciela.

1.5.2. Kolonizacja tkanek

Grzyby endofityczne bytują w prawie 300 tys. gatunków roślin lądowych, przy czym sugeruje się, że każda roślina posiada swój unikalny zestaw endofitów [Arnold, 2007]. Badania nad endofitami wykazały, że niektóre mikroorganizmy mają zdolność do zasiedlania tylko określonych tkanek lub organów rośliny gospodarza, podczas gdy inne gatunki mogą bytować w różnych tkankach tej samej rośliny. Badano również różnorodność endofitów w skórce i tkankach wewnętrznych, na przykład ksylemie. Prowadzono badania, w których analizowano zasiedlanie przez najpowszechniejsze grzyby endofityczne roślin rosnących w bliskim sąsiedztwie oraz oddalonych znacznie od siebie. Wskazano, że związek między endofitem a rośliną gospodarzem może być uwarunkowany tzw. specyficznością gospodarza, powtarzalnością gospodarza, selektywnością gospodarza lub preferencjami gospodarza i [Cohen, 2006; Selim i in., 2012; Sharma i Gautam, 2019]. Specyficzność gospodarza (ang. *host-specificity*) jest to relacja, w której mikroorganizm ogranicza się do pojedynczego gospodarza lub grupy spokrewnionych gatunków, a taka specyficzność sugeruje, że między rośliną gospodarzem a związanymi z nią endofitami zachodzi złożona interakcja biochemiczna [Strobel, 2003; Strobel i Daisy, 2003]. Zjawisko to można zinterpretować jako formę adaptacji ekologicznej, gdzie morfologicznie identyczne szczepy tego samego gatunku będą wykazywać różne cechy fizjologiczne, związane z interakcją z gospodarzem [Petrini, 1991]. Przykładem takiej interakcji jest grzyb *Pestalotiopsis microspora*, spotykany najczęściej w cisach (*Taxa*) [Tan i Zou, 2001; Firáková i in., 2007]. Powtarzalność gospodarza (ang. *host-recurrence*) odnosi się do zjawiska częstego lub dominującego występowania danego gatunku endofitu w konkretnej roślinie gospodarzu lub szeregu roślin gospodarzy, przy rzadkim występowaniu tego endofitu w innych roślinach, w tym samym siedlisku [Zhou i Hyde, 2001]. Jako selektywność gospodarza (ang. *host selectivity*) określa się zjawisko kolonizacji tkanki dwóch lub wielu roślin gospodarzy przez pojedynczy gatunek endofityczny z preferencją jednego konkretnego gospodarza roślinnego [Cohen, 2006]. Natomiast pojęcie preferencji gospodarza (ang. *host-preference*) najczęściej stosuje się przy wskazaniu wspólnego występowania lub

wyjątkowości występowania endofitów u konkretnego gospodarza, a także do wskazania różnicy w składzie zbiorowisk grzybów endofitycznych i częstości relacji u różnych roślin gospodarza [Suryanarayanan i Kumaresan, 2000]. Grzyby endofityczne są również zdolne do kolonizacji wielu gatunków roślin gospodarzy w tym samym siedlisku, a rozmieszczenie niektórych endofitów może być podobne w blisko spokrewnionych gatunkach roślin [Huang i in., 2008]. Grzyby endofityczne z rodzaju *Colletotrichum, Phoma, Phomopsis* i *Phyllosticta* mogą kolonizować kilka taksonomicznie niespokrewnionych roślin gospodarzy [Pandey i in., 2003; Jeewon i in., 2004; Murali i in., 2006; Sieber, 2007; Hyde i Soytong, 2008] – sugeruje to, że grzyby rozwinęły adaptacje, by przezwyciężyć różne typy mechanizmów obronnych gospodarza.

1.5.3. Sposób rozmnażania i transmisji grzybów endofitycznych

Powszechnie uważa się, że na bioróżnorodność, rozmieszczenie endofitów oraz charakter ich interakcji z roślinami ma wpływ, oprócz czynników biotycznych i abiotycznych, sposób rozmnażania i transmisji endofitów. Taka cecha, jak sposób przenoszenia się grzybów endofitycznych w dużej mierze determinuje przestrzenne i czasowe rozmieszczenie endofitów w tkankach roślinnych [Saikkonen i in., 2004]. Czas generacji endofitów przenoszonych wertykalnie jest stosunkowo długi, często obejmujący kilka pokoleń roślin. W przeciwieństwie do tego, liczebność i różnorodność endofitów przenoszonych horyzontalnie w roślinach kumuluje się przez cały sezon wegetacyjny, głównie w liściach [Faeth i Sullivan, 2003; Saikkonen i in., 2004].

Sposób rozmnażania określa cechy płciowe lub bezpłciowe procesu, podczas gdy sposób transmisji opisuje mechanizmy rozprzestrzeniania się grzybów endofitycznych w tkankach roślin pomiędzy generacjami, jak i pomiędzy różnymi osobnikami tego samego pokolenia. Jak dotąd opisano dwa sposoby przenoszenia się grzybów endofitycznych: wertykalny, inaczej pionowy - od rodzica do potomstwa lub horyzontalny – poziomy, pomiędzy niespokrewnionymi osobnikami. Endofity grzybowe przenoszone pionowo są bezpłciowo i przenoszą się przez strzępki grzybów bytujące w nasionach rośliny gospodarza (np. *Neotyphodium*). Grzyby te wykazują często mutualistyczny charakter, ponieważ ich cykl reprodukcyjny jest ściśle związany z rośliną gospodarzem. Natomiast grzyby przenoszone horyzontalnie, rozmnażają się przez zarodniki i mogą być przenoszone np. przez wiatr czy owady. Ich sposób rozprzestrzeniania się jest porównywalny do tego, który reprezentują patogeny grzybowe [Selosse i in., 2004].

Strzępki grzybów mogą rosnąć klonalnie w nasiona rośliny gospodarza i w ten sposób są przenoszone na potomstwo kolonizowanych roślin, co jest powszechnie określane jako przenoszenie wertykalne. Alternatywnie, grzyb może wytwarzać zarodniki i sprzyjać transmisji horyzontalnej. Aby jednak w pełni zrozumieć ekologiczne i ewolucyjne konsekwencje tych strategii historii życia, konieczne jest rozpoznanie, że grzyby mogą wytwarzać mitotyczne bezpłciowe lub mejotyczne zarodniki płciowe. Tak więc rozmnażanie grzybów bezpłciowych jest możliwe poprzez transmisję wertykalną przez nasiona rośliny-gospodarza i transmisję poziomą przez zarodniki lub ewentualnie strzępki, podczas gdy rozmnażanie płciowe wymaga wytwarzania zarodników płciowych i dlatego jest zawsze poziome [Tadych i in., 2014]. Istnieje przekonanie, że sposób rozmnażania i przenoszenia grzyba jest dostosowany do historii życia rośliny-gospodarza. Większość danych literaturowych na temat grzybów endofitycznych koncentruje się na dwóch pokrewnych rodzajach grzybów, a mianowicie *Neotyphodium i Epichloë*, które zasocjowane są z trawami. Obydwa występują jako kolonizacja ogólnoustrojowa (tj. rozrastają się przez roślinę gospodarza do rozwoju kwiatostanów/kłosów i nasion) i są przenoszone pionowo z roślin matecznych na potomstwo. Sugerowano, że endofity z rodzaju *Neotyphodium* są przenoszone wyłącznie pionowo [Clay, 1992; (Eaton i in., 2011]. Jednakże nie należy wykluczać rozprzestrzeniania się poziomego nawet w przypadku endofitów z rodzaju *Neotyphodium*, ponieważ wytwarzają one bezpłciowe konidia na podłożach wzrostowych i na żywych roślinach [di Menna i in., 2012; White Jr i Torres, 2010]. Endofity z rodzaju *Epichloë* mogą być natomiast przenoszone zarówno wertykalnie przez zarodniki jak i horyzontalnie [Clay, 1992; Schardl i in., 2004]. Tadych i in. [2014] wskazują na transmisję horyzontalną w naturalnych populacjach traw.

1.6. Molekularne mechanizmy interakcji roślin z mikroorganizmami

Rośliny będące składową większości łańcuchów pokarmowych są stale narażone na stres biotyczny. Pomimo tego, że rośliny nie mają tak zaawansowanego układu odpornościowego jak zwierzęta, to wykształciły mechanizmy pozwalające na obronę przed atakiem patogenów. Wnikanie patogenów do środka rośliny może nastąpić poprzez aparaty szparkowe, uszkodzenia fizyczne jak i bezpośrednią penetrację powierzchni rośliny . Interakcja ta obejmuje rozpoznanie rośliny gospodarza i wybór najlepszego sposobu wniknięcia do rośliny w celu kolonizacji tkanek roślinnych [Guest i Brown, 1997].

Pierwszą linią obrony roślin jest bariera fizyczna. Skórka zapobiega wnikaniu mikroorganizmów do wnętrza rośliny [Nurnberger i Lipka, 2005]. Rośliny są zdolne do rozpoznania zmian zachodzących w skórce, co powoduje aktywację mechanizmów obronnych

[Guest i Brown, 1997]. Naruszenie bariery fizycznej skutkuje zainicjowaniem drugiej linii obrony, która zmniejsza uszkodzenia strukturalne powstałe poza miejscem infekcji i uszkodzenia tkanek. Druga linia systemu obronnego opiera się na zdolności roślin do rozpoznawania niektórych mikroorganizmów na podstawie ich metabolitów wtórnych i innych wzorców molekularnych. Cząsteczki te oddziałują z powierzchnią roślin, co wzmacnia sygnały otrzymywane poprzez transmisję roślinnych cząsteczek sygnałowych, które indukują kaskady sygnałowe i aktywują geny związane z reakcjami obronnymi i odpornościowymi u odmian odpornych [Reimer-Michalski i Conrath, 2016].

1.6.1. Odporność wrodzona

W przypadku odporności wrodzonej możemy wyróżnić odporność nieswoistą (ogólną) – która zapewnia roślinom (bez rozróżniania na gatunek) obronę przeciwko różnym szczepom i gatunkom mikroorganizmów oraz odporność swoistą, która zapewnia ochronę jednemu gatunkowi rośliny przeciwko specyficznym, wybranym mikroorganizmom. Odporność nieswoista jest charakterystyczna dla większości roślin. Trwałą, a zarazem najbardziej powszechną formą odporności roślin jest odporność „*non-host”*, która zapewnia odporność wszystkim gatunkom roślin na wszystkie szczepy mikroorganizmów. Wyróżnia się dwa typy odporności „*non-host”*. W pierwszym typie odporności, rośliny rozpoznają elicytory wydzielane przez patogeny (PAMP - ang. *pathogen-associated molecular patterns*), następnie dochodzi do aktywacji odpowiedzi obronnej poprzez kaskadę kinaz MAP co wpływa na wzmocnienie ściany komórkowej roślin poprzez jej lignifikację, akumulację związków fenolowych, produkcję saponin i fitoaleksyn oraz indukcję genów kodujących białka związane z patogenezą (ang. *pathogenesis-related protein,* PR) [O'Brien i in., 2012]. System obronny rośliny zahamowuje infekcję, sprawiając, że nie obserwuje się widocznych symptomów chorobowych, jak na przykład nekroz, które są wynikiem reakcji nadwrażliwości (ang. *hypertensive response*, HR). Drugi typ odporności „*non-host*" jest zawsze związany z aktywacją mechanizmu obronnego prowadzącego do reakcji nadwrażliwości [Mysore i Ryu, 2004]. Fenotypowo jest on bardziej podobny do odporności typu „gen na gen". Rośliny rozpoznają substancje wydzielane przez patogeny, w cytoplazmie lub błonie komórkowej rośliny, aktywując mechanizm obronny. Zapobiega to dalszemu rozprzestrzenianiu się patogenów w komórkach roślinnych. Równowaga między reaktywnymi formami tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) a antyoksydantami jest kluczowym elementem w ograniczeniu infekcji w roślinie[Király i in., 2007]. Odporność podstawowa występuje na wczesnym etapie interakcji roślina gospodarz – mikroorganizm. Receptory roślinne rozpoznają elicytory wydzielane przez mikroorganizmy lub metabolity, które powstają w wyniku lizy ściany

komórkowej rośliny gospodarza. Ten typ odporności roślin obejmuje nagromadzenie się ROS, wzrost aktywności genów PR (chitynazy i β-1-3-glukanazy) oraz akumulację składników przeciwmikrobiologicznych [Kiraly i in., 2007]. Podczas interakcji rośliny z grzybami najczęściej obserwuje się odporność polegającą na trwałym wyciszeniu genów patogenu odpowiedzialnych za infekcję oraz odporność, która hamuje tempo wzrostu patogena i ogranicza jego sporulację [Song i in., 2003]. W tym przypadku dochodzi do akumulacji ROS, natomiast nie obserwuje się reakcji nadwrażliwości [Kiraly i in., 2007].

W przypadku odporności swoistej można wyróżnić kilka typów odporności swoistej, m.in.: odporność ekstremalną, odporność „gen na gen", odporność przeciw toksynom. Odporność ekstremalna oparta jest na mechanizmie „gen na gen", jednakże nie występuje tu reakcja nadwrażliwości [Bendahmane i in., 1999]. Nie poznano jednak mechanizmów molekularnych czy biochemicznych aktywujących tę odporność [Kiraly i in., 2007]. Odporność swoista „gen na gen" charakteryzuje się powstawaniem nekroz tkankowych rozwijających się w zainfekowanych tkankach roślinnych. Interakcja „gen na gen" rozpoczyna się od rozpoznania patogenu i podczas odpowiedzi aktywowany jest łańcuch transdukcji sygnału [Garrido i Pérez-Martín, 2003]. Niektóre metabolity wtórne wydzielane przez szczepy grzybów mogą wywołać choroby roślin. Swoista odporność przeciw toksynom zakłada, że rośliny wytwarzają białka/enzymy odpowiedzialne za rozkład i dezaktywację toksyn. Skutecznym sposobem jest również sekrecja toksyn z odpornych roślin [Diener i in., 2004].

1.6.2. Odporność nabyta

Odporność nabyta rozwija się u roślin po pierwotnej infekcji grzybowej, która sprawia, że otaczające tkanki i oddalone od miejsca infekcji części roślin nabywają odporność przed kolejnymi infekcjami. Ten rodzaj odporności jest analogiczny do pamięci immunologicznej zwierząt wyższych, jednak mechanizmy są zupełnie inne. Nabyta odporność jest indukowana w tkankach odległych od miejsca infekcji. Roślina rozwija „pamięć stresową" jako konsekwencję pierwotnej infekcji, nie zapewnia jednak ochrony roślinie żywicielskiej przed kolejnymi atakami patogenów, ale może spowodować osłabienie objawów chorobowych[Liu i in., 2021]. Nabytą odporność można podzielić na lokalną odporność nabytą (ang. *local acquired resistance*, LAR), która aktywowana jest w komórkach otaczających zainfekowane miejsce i systemową: systemiczną odporność indukowaną (ang. *induced systemic resistance,* ISR) oraz systemiczną odporność nabytą (ang. *systemic acquired resistance,* SAR) [Kiraly i in., 2007; (Busby i in.; 2016]. Mechanizm odporności nabytej można podzielić na następujące etapy: rozpoznanie elicytorów przez komórki roślinne, przekazanie sygnału do oddalonych

organów roślinnych oraz ekspresja genów związanych z reakcjami obronnymi i odpornościowymi mając na celu ograniczenie wnikania mikroorganizmów do tkanek rośliny gospodarza [Henry i in., 2012]. Lokalna odporność nabyta prowadzi do systemicznej odporności nabytej. LAR stymuluje rośliny do produkcji białek PR, produkcji metabolitów wtórnych (szczególnie terpenów i fenylopropanoidów) oraz kwasu salicylowego (ang. *salicylic acid*, SA) [Costet i in., 1999]. Elicytorami aktywującymi ISR są wzorce molekularne związane z niepatogennymi mikroorganizmami (ang. *microbe-associated molecular patterns* MAMP). w ISR zaangażowane są szlaki sygnalne kwasu jasmonowego (ang. *jasmonic acid,* JA) oraz etylenu (ET) [Henry i in., 2012], natomiast nie zaobserwowano akumulacji kwasu salicylowego czy ekspresji białek PR [Vallad i Goodman, 2004].

SAR aktywowana jest w oddalonych od miejsca infekcji organach roślinnych. Elicitorami SAR są: wzorce molekularne związane z patogenami (ang. *pathogen-associated molecular patterns,* PAMP), fragmenty ściany komórkowej roślin uwalniane w wyniku działania patogennych enzymów (ang. *damage-associated molecular patterns*, DAMP), elicitory chemiczne oraz zranienie. Natomiast mobilnymi cząsteczkami sygnalnymi SAR są: metylosalicylan (MeSA), kwas azelainowy i diterpenoid [Henry i in., 2012]. Rodzaj mobilnych cząsteczek sygnalnych uczestniczących w SAR jest determinowany gatunkiem rośliny oraz typem interakcji roślina gospodarza – mikroorganizm. Są odpowiedzialne za przekazywanie sygnału z miejsca infekcji do pozostałych organów, co prowadzi do akumulacji SA, a w konsekwencji do wzrostu ekspresji genów białek PR [Steven i Xinnian, 2012]. Mobilną cząsteczką sygnalną indukującą odporność jest metylosalicylan (MeSA) powstający z SA w wyniku działania enzymu metylotransferazy w zainfekowanych komórkach. Transport cząsteczkek MeSA z komórki do komórki odbywa się przez plasmodesmy, a do pozostałych organów roślinnych przez floem. Do powtórnego przekształcenia z MeSA do SA dochodzi przy udziale enzymu esterazy MeSA, co zapewnia odpowiedni poziom SA w komórkach [Muthamilarasan i Prasad, 2013; Steven i in., 2012]. SAR zapewnia roślinie większą odporność podczas kolejnych ataków patogenów. Dzięki tak wytworzonej pamięci immunologicznej, związanej z procesem przygotowania komórki (ang. *priming*), może zostać ona przekazana następnym generacjom. „*Priming*" zostaje aktywowany podczas akumulacji w komórce składników sygnalnych, uruchamianych jedynie w przypadku kolejnej infekcji patogenami. Przygotowanie komórek polega na akumulacji nieaktywnych MPK3 i MPK6 oraz NPR1 (zarówno mRNA jak i białek), które ulegną aktywacji dopiero po infekcji [Shah i Zeier, 2013]. Kwas salicylowy wpływa na modyfikację chromatyny: zmiany w metylacji i acetylacji DNA i histonów, a tym samym na

procesy związane z aktywacją genów zaangażowanych w mechanizm odporności. Lokalna infekcja może zmieniać status metylacji i acetylacji histonów, a w szczególności wpływać na sekwencje promotorów genów w tkankach systemicznych [Steven i in., 2012].

1.6.3. Systemy obronne roślin

Wzajemne oddziaływanie między systemami obronnymi roślin a ich tłumieniem przez patogeny zostało przedstawione jako „model zigzag" przez Jonesa i Dangla [2006]. Model ten sugeruje, że odpowiedzi immunologiczne roślin składają się z dwóch gałęzi. Pierwszą linią obrony u roślin jest rozpoznanie konserwatywnych cząsteczek charakterystycznych dla wielu drobnoustrojów. Te elicytory są również znane jako wzorce molekularne związane z drobnoustrojami lub patogenami (MAMP lub PAMP). MAMP są niezbędnymi strukturami dla drobnoustrojów dlatego też występują u patogenów, mikroorganizmów niepatogennych, jak i saprofitycznych. MAMP są rozpoznawane przez receptory rozpoznawania wzorców (ang. *pattern recognition receptors,* PRR), które są zlokalizowane na powierzchni komórek roślinnych; ta pierwsza faza indukcji obronnej nazywana jest odpornością wyzwalaną przez MAMP (ang. *MAMP-triggered immunity,* MTI) [Ausubel, 2005; Jones i Dangl, 2006]. Drugą linią obrony roślin jest bezpośrednie lub pośrednie rozpoznanie danego efektora poprzez zestaw produktów genów odporności roślin (R), co skutkuje odpornością wyzwalaną przez efektor (ang. *effector-triggered immunity,* ETI) [Jones i Dangl, 2006]. ETI jest na ogół przyspieszoną i wzmocnioną odpowiedzią MTI i jako taka jest skuteczną odpowiedzią obronną, która w większości przypadków prowadzi do śmierci komórki, znanej jako reakcja nadwrażliwości (ang. *hypersensitive response*, HR). HR obejmuje nagromadzenie się ROS, akumulację kwasu salicylowego oraz wzrost ekspresji genów zaangażowanych w szlaki biosyntezy fenylopropanoidów i terpenoidów [Costet i in., 1999]

1.6.4. Białka PR

Jak wspomniano wcześniej, podczas interakcji rośliny z patogenem aktywowany jest mechanizm indukcji ETI w roślinach, co prowadzi do akumulacji białek związanych z patogenezą [Mazumder, 2013]. Nagromadzenie PR zapobiega ponownym infekcjom, co skutkuje rozwojem SAR [Zhang i in., 2013]. Zostały one podzielone na podstawie masy molekularnej, właściwości biologicznych, sekwencji aminokwasowych na 17 rodzin [Kaur i in., 2017]. Białka te mają różnorodne funkcje, poczynając od wzmocnienia ściany komórkowej roślin, transdukcji sygnału i aktywności antymikrobiologicznej. W roślinach głównie występują chitynazy, glukazany i białka podobne do taumatyny [(Farrakh i in., 2018].

PR są małe (10-40 kDA), dzięki czemu mogą gromadzić się w przestrzeniach wewnątrz- i międzykomórkowych. Niektóre geny kodujące białka związane z patogenezą są uważane za geny sygnaturowe szlaków kwasu salicylowego i kwasu jasmonowego (ang. *jasmonic asid*, JA) w wielu roślinach uprawnych, w których patogeny biotroficzne aktywują szlak SA, a patogeny nekrotroficzne aktywują szlak JA [Ali i in., 2017]. Wiele PR ma działanie przeciwgrzybicze, co wynika m.in. z hydrolitycznego wpływu na ściany komórkowe [Zandvakili i in., 2017]. Niektóre PR, jak np. PR10 mogą działać jako RNazy, co sugeruje, że mogą degradować RNA grzybów podczas infekcji [Chen i in., 2013]

1.6.5. Ściana komórkowa w odporności roślin

Pierwszą, zewnętrzną barierę roślin przed infekcjami stanowi ściana komórkowa, zbudowana głównie z celulozy, pektyn, hemicelulozy i lignin; zawiera również białka strukturalne [Keegstra, 2010; Somerville i in., 2004]. Mikroorganizmy atakując roślinę wydzielają enzymy degradujące ścianę komórkową. W początkowym etapie dochodzi do degradacji pektyn poprzez działanie pektynaz, a w konsekwencji do rozluźnienia struktury ściany komórkowej i odsłonięcia pozostałych składników ściany, umożliwiając w ten sposób rozkład celulozy i hemicelulozy przez enzymy grzybowe. Poprzez działanie enzymów wydzielanych przez mikroorganizmy uwalniane są oligogalakturoniany, fragmenty pektyn pełniące rolę elicytorów, i tym aktywujące mechanizmy obronne roślin [(Miedes i in., 2014].

1.6.6. Fitohormony w odporności roślin

Fitohormony opisywane są jako cząsteczki niezbędne do prawidłowego rozwoju, wzrostu i przeżycia roślin, działają w niskich stężeniach jako cząsteczki sygnalne. Główne hormony produkowane przez rośliny to auksyny, gibereliny (GA), cytokininy (CK), kwas abscysynowy (ABA), etylen (ET), kwas salicylowy (SA), kwas jasmonowy (JA), brassinosteroidy (BR) i strigolaktony. Wśród nich wiadomo, że ABA, SA, JA i ET odgrywają główną rolę w pośredniczeniu w odpowiedzi obronnej roślin na patogeny i stresy abiotyczne [Bari i Jones, 2009; Nakashima i Yamaguchi-Shinozaki, 2013]. Zazwyczaj ABA odpowiada za obronę roślin przed stresami abiotycznymi, ponieważ wiadomo, że warunki środowiskowe, takie jak susza, zasolenie, zimno, stres cieplny i zranienia, powodują wzrost poziomów ABA [Lata i Prasad, 2011; Zhang i in., 2006]. Natomiast SA, JA i ET odgrywają główną rolę w odpowiedzi na warunki stresu biotycznego, ponieważ ich poziom wzrasta wraz z infekcją patogenem [Bari i Jones, 2009]. Jednak mechanizm reakcji na stres nie ogranicza się wyłącznie do tych hormonów. Badania dostarczyły istotnych dowodów na interakcje ABA, SA, JA i ET z auksynami, GA i CK w regulacji odpowiedzi obronnej roślin [Bari i Jones, 2009; Navarro i in., 2008; Nishiyama i in., 2013].

SA, JA i ET odgrywają znaczącą rolę w regulowaniu odpowiedzi obronnych roślin przed różnymi patogenami i szkodnikami [Bari i Jones, 2009]. SA bierze udział w aktywacji odpowiedzi obronnej przeciwko patogenom biotroficznym i hemibiotroficznym [Loake i Grant, 2007], podczas gdy JA i ET są odpowiedzialne za obronę przed patogenami nekrotroficznymi i owadami roślinożernymi [Wasternack i Hause, 2013; Gamalero i Glick, 2012].

Synteza SA zachodzi w odpowiedzi na interakcję rośliny z patogenem. Gdy szlak SA zostanie aktywowany w miejscu infekcji, reakcja obronna jest często wyzwalana w dystalnych częściach rośliny w celu ochrony nieuszkodzonych tkanek. Ponadto wzrost poziomu SA w tkankach eksponowanych na patogen powoduje indukcję genów PR [van Loon i in., 2006]. Jednym z kluczowych elementów regulatorowych w zależnej od SA aktywacji genów PR jest NPR1 (ang. *non-expressor of PR gene 1*). Wiadomo, że SA reguluje deoligomeryzację NPR1 do jego aktywnych form monomerycznych [Loake i Grant, 2007]. Wzrost poziomu JA w odpowiedzi na infekcję patogenem wyraźnie podkreśla jego udział w odpowiedzi obronnej roślin [Wasternack i Hause, 2013]. ET odgrywa różne role w odpowiedzi obronnej roślin [Bari i Jones, 2009; Gamalero i Glick, 2012]. W warunkach osmotycznych, takich jak wysokie zasolenie i susza, ABA stymuluje krótkoterminowe reakcje, takie jak zamykanie aparatów szparkowych, co skutkuje utrzymaniem równowagi wodnej [Busk i Pages, 1998] i długoterminowymi reakcjami wzrostu poprzez regulację genów reagujących na stres.

Szlaki sygnałowe ABA, SA, JA i ET oddziałują między sobą w różnych punktach, jak chociażby produkcja czynników transkrypcyjnych reagujące na hormony w celu regulacji odpowiedzi obronnej roślin. Warto jednak zauważyć, że adaptacja całej rośliny i zrównoważony wzrost to kluczowe cechy właściwej odpowiedzi obronnej w warunkach stresowych. Dlatego interakcje ABA, SA, JA i ET z głównymi hormonami promującymi wzrost, tj. auksynami, giberelinami i cytokininami, odgrywa ważną rolę w pośredniczeniu w odpowiedzi na stres. Również reakcje obronne aktywowane w roślinach w odpowiedzi na różne stresy zależą od rodzaju interakcji między szlakami sygnalizacji hormonalnej, a nie wyłącznie od indywidualnego wkładu każdego hormonu. Szlaki sygnałowe SA i JA przecinają się w różnych punktach, ponieważ SA i JA antagonistycznie regulują odpowiedzi na stres biotyczny [Bari i Jones, 2009; Spoel i in., 2003]. Chociaż większość badań dowodzi antagonistycznej interakcji między SA i JA, to przy niskich stężeniach SA-JA i jednoczesnej indukcji obu mechanizmów obronnych obserwowano interakcje synergistyczne [Li i in., 2004; Peterson i in., 2000]. W przeciwieństwie do, w dużej mierze antagonistycznych funkcji SA i JA,

JA i ET działają synergistycznie w regulacji genów związanych z obroną po zakażeniu patogenem. Zarówno szlaki JA, jak i ET wykazują synergię w rozwoju włośników i odporności na nekrotrofy [Zhu i in., 2011]. Dodatnia interakcja JA-ET powoduje indukcję genów kodujących inhibitory proteinazy w odpowiedzi na zranienie pomidora [O'Donnell i in., 1996]. Podobnie zarówno JA, jak i ET są wymagane do jednoczesnej aktywacji genów PR [(Lorenzo i in., 2003]. Auksyny są odpowiedzialne za regulację rozwoju roślin. Wiążą się z etylenem w celu regulacji rozwoju korzeni i architektury, co jest kluczowym aspektem tolerancji na suszę i zasolenie [Kohli i in., 2013]. Ujemna regulacja tworzenia korzeni bocznych i dodatnia regulacja tworzenia korzeni przybyszowych przez etylen poprzez modulację transportu auksyny stanowi kolejny przykład interakcji auksyny-etylenu w modyfikacji architektury korzenia [Negi i in., 2010]. Cytokininy są również znane z interakcji z kaskadą sygnalizacyjną SA w celu regulacji mechanizmów obronnych roślin. Wykazano zwiększoną odporność na infekcję hemibiotroficznych patogenów [Reusche i in., 2013]

1.7. Rola i znaczenie grzybów endofitycznych

Mikroorganizmy endofityczne promują wzrost roślin i zapewniają ochronę przed szkodnikami i patogenami poprzez różne mechanizmy [Busby, i in. 2016a; 2016b; Fessel i Zuccaro]. Endofity wytwarzają i wydzielają wtórne metabolity, które zmniejszają negatywne skutki patogenów roślin, w tym związki lotne, które są w stanie powstrzymać wzrost patogenów [Kottb i in., 2015]. Inne endofity chronią swoją roślinę żywicielską poprzez indukowanie mechanizmów obronnych roślin [Shoresh i in., 2010], co można osiągnąć przez ogólnoustrojową odporność nabytą (SAR) lub indukowaną odporność systemiczną (ISR) [Busby i in., 2016b; Suárez-Estrella i in., 2013]. Przykładem mechanizmu obronnego indukowanego przez żywiciela jest P. *indica*, indukujący odpowiedź obronną zależną od JA u A. *thaliana* poprzez koinokulację patogenem [Stein i in., 2008]. Niektóre endofity mogą demonstrować swój potencjał jako czynnik biokontroli poprzez wydzielanie związków przeciwgrzybiczych i przeciwbakteryjnych, hamując w ten sposób współzawodnictwo patogenów. Endofity również bezpośrednio konkurują z patogenami gospodarza o przestrzeń i składniki odżywcze [Alabouvette i in., 2009]. Dolistna aplikacja wyjałowionych liści *Theobroma cacao* mieszanką endofitów hamuje rozwój nekrozą wywoływanych przez *Phytophthora sp*. [Arnold i inni, 2003]. Mechanizm obronny aktywowany został w inokulowanych liściach i nie mógł być łatwo skorelowany z interakcjami endofitów *in vitro,* co sugeruje, że złożone interakcje międzygatunkowe (takie jak konkurencja i wzajemny antagonizm) mogą odgrywać ważną rolę w pośredniczeniu w wynikach obrony gospodarza.

Oprócz bezpośredniej ochrony roślin gospodarza przed patogenami, endofity mają też właściwości promujące wzrost roślin. Endofity te nie tylko dostarczają składników odżywczych, takich jak azot, fosfor i żelazo, ale mogą ułatwiać wzrost i rozwój roślin poprzez stymulację wzrostu [Saleem i in., 2007]. Związane z korzeniami mikroorganizmy mogą wytwarzać związki chemiczne, które wpływają na wzrost i rozwój roślin. Należą do nich hormony roślinne kwas indolo-3-octowy (IAA), gibereliny i cytokininy [Nadeem i in., 2016]. Endofity mogą również modulować hormony roślinne, takie jak auksyna, cytokinina, etylen i giberelina oraz wytwarzać inne związki bioaktywne [Joseph i Priya, 2011].

Endofity zapewniają gospodarzom korzystne właściwości biologiczne, takie jak odstraszanie drobnoustrojów chorobotwórczych, owadów i innych roślinożerców, a także dostarczają stymulatorów wzrostu i rozwoju roślin [Sudha i in., 2016]. Ponieważ patogeny roślin i szkodniki są dobrze poznanymi czynnikami limitującymi plony o około 30 do 50% rocznie [Mousa i Raizada, 2013], endofity, których korzystne właściwości mogą poprawić kondycję roślin i plony przy jednoczesnym zachowaniu jakości i bezpieczeństwa, stanowią godną uwagi drogę w przeciwdziałaniu utraty plonów. Endofity mogą łagodzić abiotyczne i biotyczne czynniki stresogenne, takie jak susza, zasolenie, metale ciężkie i inne toksyczne związki wprowadzane przez środowisko, powódź, ekstremalne temperatury, drapieżniki i patogeny [Su i in., 2021].

Susza jest jednym z istotnych stresów zmniejszających plony i bezpośrednio zagrażającym osiągnięciu bezpieczeństwa żywnościowego w krajach rozwijających się. u roślin wyzwalany jest szereg reakcji fizjologicznych i biochemicznych w warunkach suszy, takich jak zamknięcie aparatów szparkowych, wzmożone oddychanie, zahamowanie wzrostu i fotosyntezy. Rola endofitów w zapewnianiu tolerancję na stres suszy poprzez regulację genów indukowanych stresem odnotowano u ogórka [Waqas i in., 2012], kukurydzy [Guler i in., 2016; Hosseini i in., 2019], ryżu [Pandey i in., 2016], pomidora [Valli i Muthukumar, 2018], pszenicy [Ripa i in., 2019] i trzciny cukrowej [Vargas i in., 2014]. Łagodzenie stresu suszy na skutek działania endofitów może być wynikiem wzrostu enzymów antyoksydacyjnych, związków bioaktywnych, zawartości chlorofilu, zawartości karotenoidów i fluorescencji chlorofilu. Grzyb P. *indica*, stymuluje wzrost rośliny, zwiększa zawartość chlorofilu i wspomaga kształtowanie ziaren w warunkach suszy. Endofit ten jest jednym z mikroorganizmów, który wspomaga tolerancję na suszę u pszenicy [Ripa i in., 2019]. Badano również grzyby z rodzaju *Fusarium, Trichoderma, Penicillium, Aspergillus, Alternaria* pod kątem wpływu na wzrost roślin i ich tolerancję na stres. Większość z nich zwiększała tolerancję pszenicy na suszę.

Udowodniono, że rośliny związane z grzybami endofitycznymi (np. ryż czy pomidor) potrzebują znacznie mniej wody do produkcji biomasy niż rośliny nie wchodzące w interakcje symbiotyczne. Związane jest to z zwiększoną akumulacją substancji rozpuszczonych w tkankach roślin, w których bytują endofity w porównaniu z roślinami pozbawionymi endofitów, spowolnieniem strumienia transpiracyjnego lub tworzeniem się grubszej kutykuli [Ripa i in., 2019]

Zasolenie to kolejny istotny stres abiotyczny ograniczający wzrost i produktywność roślin na całym świecie. Tolerancja na stres solny jest związana z aktywacją enzymów antyoksydacyjnych, tj. ROS, w tym glutationu, askorbinianu i tokoferolu oraz enzymów dysmutazy ponadtlenkowej (ang. *superoxide dismutase*, SOD), katalaz (ang. *catalase*, CAT), peroksydaz zależnych od askorbinianu lub tiolu (ang. *ascorbate- or thiol-dependent peroxidase*, APX), reduktazy glutationowej (ang. *glutathione reductase*, GR), reduktazy dehydroaskorbinianowe (ang. *dehydroascorbate reductase*, DHAR) i reduktazy mondehydroaskorbinianowe (ang. *mono-dehydroascorbate reductase*, MDHAR) [Rouhier i in., 2008]. Enzymy te są zaangażowane w usuwanie ROS bezpośrednio (SOD, CAT i APX) lub pośrednio poprzez odbudowę askorbinianu i glutationu w komórce. Na przykład grzyb P. *indica* zwiększa produkcję biomasy roślin w warunkach stresu solnego poprzez intensyfikację ich zdolności antyoksydacyjnych, zmianę składu kwasów tłuszczowych, aktywację peroksydazy lipidowej, reduktazy dehydroaskorbonianowej, katalazy i akumulację enzymów reduktazy glutationowej w jęczmieniu [Baltruschat i in., 2008]. Według Murphy i in. [2018] szczep LHL08 gatunku z rodzaju *Exopiala* wyizolowanego z korzenia ogórka, nadaje roślinom ryżu tolerancję na zasolenie i stres suszy u ryżu. Wzrost tolerancji ryżu na zasolenie zaobserwowano również w wyniku inokulacji gatunkami *P. indica* oraz *S.vermifera,* a najlepsze efekty obserwowano w obecności obu tych grzybów [Franken, 2012]. Ponadto u ryżu zaobserwowano stymulację wzrostu roślin, długości korzeni oraz większą akumulacją osmolitów po traktowaniu roślin endofitycznym szczepu FcRed1 grzyba *Fusarium culmorum* [Egamberdieva i in., 2017; Ma i in., 2019]. Odnotowano, że obecność endofitycznych grzybów w roślinie może zmniejszać też poziom proliny, który wzrasta w roślinie w warunkach stresu solnego [Abdelaziz i in., 2019]. Zmniejszanie cytoplazmatycznego stresu osmotycznego spowodowanego wzrostem stężenia soli w ryzosferze jest kontrolowany przez ABA [Cao i in., 2014].

Grzyby endofityczne mogą pośredniczyć w regulacji szkodliwego wpływu wysokiej temperatury na roślinę poprzez regulację lub modyfikację aktywności fizjologicznej,

biochemicznej i metabolicznej roślin w zależności od ich biologii, stadium rozwojowego i odmiany rośliny gospodarza. Prowadzono badania dotyczące interakcji endofitów z roślinami gospodarzami w warunkach stresu wysokiej temperatury oraz ich roli w aklimatyzacji roślin do środowiska i tolerancji stresu [Lata i in., 2018]. Badania Ali i in. [2018] wykazały, że inokulacja roślin ogórka termofilnym endofitem z rodzaju *Thermomyces* zmniejszała niekorzystne skutki stresu termicznego, utrzymując maksymalną wydajność fotosystemu II, szybkość fotosyntezy i efektywność wykorzystania wody. Ponadto traktowanie roślin *Thermomyces sp.* powodowało znaczną akumulację cukrów, flawonoidów, saponin, rozpuszczalnych białek i zwiększenie aktywności enzymu antyoksydacyjnego w warunkach stresowych wysokiej temperatury. Zaobserwowano, że korzenie roślin ogórka traktowane grzybami z rodzaju *Thermomyces* były dłuższe w porównaniu do korzeni nietraktowanych roślin. Wzrost korzeni jest istotną cechą adaptacyjną w ekosystemach pustynnych; rośliny poddane stresowi termicznemu zwiększają przewodnictwo szparkowe, a tym samym wskaźnik transpiracji. Termofilne grzyby zapobiegają nadmiernej utracie wody z rośliny poprzez zamykanie aparatów szparkowych jako fizjologiczno-adaptacyjna strategia oszczędzania wody przed dalszymi uszkodzeniami spowodowanymi stresem temperaturowym [Ali i in., 2018].

Zanieczyszczenia metalami ciężkimi są poważnym problemem w krajach rozwijających się. Akumulacja metali ciężkich w roślinach poprzez glebę i wodę hamuje ich wzrost ale może stanowić zagrożenie dla życia i zdrowia ludzi oraz zwierząt. Stąd bioremediacja i augumentacja z udziałem mikroorganizmów ma kluczowe znaczenie. W tym kontekście, interakcje symbiotyczne roślin z endofitami wzmacniają aktywność enzymów antyoksydacyjnych poprzez pobieranie metali ciężkich z gleby, a następnie ich detoksykację i transport prowadzony w wyniku aktywację genów: *ZYP, PCS* i *MTP* [Ma i in., 2016; Wang i in., 2016b]. Wykazano że grzyby endofityczne z rodzaju *Penicillium, Mucor, Alternaria, Microsphaeropsis* mogą łagodzić niekorzystne skutki stresu metalami ciężkimi u roślin. Stwierdzono, że endofity biorą udział w biosorpcji kadmu [Xiao i in., 2010], miedzi [Li i in., 2012] oraz chlorku sodu [Khan i in., 2013] i w ten sposób stabilizują negatywny wpływ metali ciężkich [Khan i in., 2013]. Zahoor i in. [2017] wyizolowali i przebadali niektóre endofity, hodując je na glebach skażonych metalami ciężkimi (chromem, kobaltem, miedzią, manganem i cynkiem). Zaobserwowano, że niektóre szczepy z rodzaju *Mucor* (szczep MHR-7) hodowane na glebach skażonych metalami ciężkimi (chromem, kobaltem, miedzią, manganem i cynkiem) mają zdolność do tolerancji ich toksyczności. Natomiast traktowanie roślin pszenicy rosnących w glebie skażonej metalami ciężkimi, grzybem P. *roqueforti* przyczyniło się do ograniczenia

przenoszenia metali ciężkich z gleby do roślin [Malik i in., 2020]. Ponadto rośliny pszenicy były wyższe, zaobserwowano również niskie stężenie metali ciężkich w pędzie i korzeniach.

1.7.1. Zastosowanie grzybów endofitycznych w integrowanej ochronie roślin.

Nadrzędnym celem produkcji roślinnej jest uzyskanie jak najwyższych plonów. Należy jednak mieć na uwadze wpływ produkcji na środowisko naturalne. Podejściem, które można wykorzystać do rozwiązania problemów z chwastami, szkodnikami i patogenami jest zintegrowana ochrona roślin (ang. *integrated pest management*, IPM) [Mrówczyński, 2013]. Strategia ta koncentruje się na długoterminowym zapobieganiu występowania szkodników/patogenów i ograniczaniu wywoływanych przez nie szkód i chorób poprzez połączenie kontroli biologicznej, modyfikacji praktyk agronomicznych i stosowanie odpornych odmian. Pestycydy są stosowane tylko wtedy, gdy wymaga tego potrzeba, zgodnie z ustalonymi wytycznymi. Środki do zwalczania szkodników i patogenów są wybierane i stosowane w sposób minimalizujący ryzyko dla zdrowia ludzkiego, mikroorganizmów pożytecznych [Jamiołkowska i in., 2017]. W Polsce od 1 stycznia 2014 roku obowiązuje przestrzeganie zasad IPM, zgodnie z rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi, przez wszystkich profesjonalnych użytkowników. Rozporządzenie to oparte jest na Rozporządzeniu nr 1107/2009 oraz art. 14 dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady Wspólnoty Europejskiej nr 2009/128/WE z dnia 21 października 2009. W myśl tej dyrektywy przez „użytkownik profesjonalny" rozumie się każdą osobę, która stosuje pestycydy w toku swej działalności zawodowej [Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, 2021]. Regulacje prawne nakazują powszechne stosowanie metod integrowanych, gdzie pierwszeństwo mają metody mechaniczne i biologiczne.

1.7.2. Biologiczna kontrola

Rozwój odporności szkodników i patogenów na pestycydy/środki agrochemiczne wymaga bardziej zrównoważonych rozwiązań, najlepiej zarządzania środowiskiem pestycydowym przy użyciu środków kontroli biologicznej [Baron i Rigobelo, 2021]. Kontrola biologiczna definiowana jest jako zmniejszenie populacji patogenów lub czynników warunkujących chorobę przez organizm, który nie jest człowiekiem ani rośliną [Cook i Baker, 1983]. Jest również określana jako próba przeniesienia powszechnego zjawiska z natury do systemów rolniczych, z wykorzystaniem naturalnych i ustalonych zależności [Mathre i in., 1999]. Biopestycydy muszą spełnić kilka wymogów, takich jak np.: nieszkodliwość dla roślin, ludzi i zwierząt, skuteczność w kontroli patogenów, bardzo dobra przeżywalność w niesprzyjających warunkach środowiskowych, są ekonomicznie opłacalne [Jatala i in., 1981;

De Souza i in., 2015]. Z uwagi na rolę jaką grzyby endofityczne mogą pełnić w roślinie, co zostało opisane w rozdziale 1.7., mikroorganizmy te mają potencjał do wykorzystania w biologicznej ochronie roślin [Mane i in., 2018; Grabka i in., 2022]. Endofity poprawiają kondycję roślin poprzez stymulację wzrostu i rozwoju oraz plonowania roślin uprawnych, ale też poprzez bezpośrednie antagonistyczne oddziaływania z ich patogenami, wykorzystując procesy konkurencji, antybiozy czy mykopasożytnictwa [Lugtenberg i in., 2016; Daguerre i in., 2017; Murphy i in., 2018; Singh i in., 2021, Sansawal i in., 2017; Bamisile i in., 2018]. Grzyby z rodzaju *Aspergillus, Colletotrichum, Fusarium, Petriella, Piriformospora, Trichoderma, Epicoccum, Epichloë* itp. to tylko niektóre przykłady zdolne do uruchomienia odporności na stres biotyczny, jednocześnie stymulujące wzrost rośliny gospodarza [Sallam i in., 2021; Gonzalez i in., 2020; Rojas i in., 2020]. Grzyby te bytują w roślinach uprawnych nie wywołując symptomów chorobowych, więc mogą być uważane za potencjalne środki kontroli biologicznej (ang. *biological control agent*, BCA) [Adeleke i in., 2022]. Grzyby z rodzaju *Epichloë* zapewniają odporność roślinie gospodarzowi oraz zwalczają owady roślinożerne [Laihonen i in., 2022]. *Piriformospora indica* – grzyb kolonizujący korzenie roślin kserofitycznych, najczęściej pszenicy, ryżu, kukurydzy, jęczmienia [Arora i in., 2022] – przyspiesza produkcję fitoaleksyn, aktywację askorbinianu glutationu (enzymu obrony antyoksydacyjnej) [Waller i in., 2005]. Badania wykazały, że grzyb *P. indica* zmniejsza występowanie chorób tj. mączniaka, mozaikowatość liści czy zwalcza nicienie [Waller i in., 2005]. Grzyby w rodzaju *Trichoderma* kolonizują korzenie oraz części nadziemne roślin wielu roślin uprawnych, takich jak soja, pszenica, kukurydza czy pomidor, wykazując przy tym działanie antagonistyczne wobec wielu patogenów grzybowych [Rai i in., 2016; Kumar i in., 2012]. Niektóre szczepy grzybów *Trichoderma*, głównie z gatunku *T. harzianum, T. koningii, T. atroviride, T. virens, T. reesei* i *T. citrinoviride* zostały opisane jako te mające potencjał do kontroli biologicznej [Singh i in., 2021]. Nuangmek i in. [2021] odkryli szczep *T. phayaoense*, który dzięki swoim właściwościom mykopasożytniczym i przeciwgrzybiczym przeciwko patogenom grzybowym redukował ponad 90% grzybni. Doniesiono również, że szczepy *T. botryosum, T. caeruloviride, T. lentissimum* i *T. pseudopyramidale* wyizolowane z dzikiej kawy w Afryce dzięki właściwościom mykopasożytniczym zapewniają biologiczną ochronę uprawom [(Del Carmen i in., 2021]. Dodatkowo grzyby te mogą produkować fitohormony (kwas indolo-3-octowy (IAA) lub analogi auksyn, kwas abscysynowy i gibereliny) [Basińska-Barczak, 2021] siderofory i inne substancje promujące wzrost roślin (6-pentyloapiron, cyklonerodiol, harzianolid i koningininy) wzbogacając mykoflorę gleby [El Enshasy i in., 2020; Keswani i in., 2022]. Innym grzybem endofitycznym występującym w glebie oraz wielu roślinach uprawnych

jest *Myrothecium verrucaria* uważany za naturalny mykoherbicyd za względu na produkcję fitoaleksyn i enzymów litycznych [Clarke i in., 2007]. Grzyb *Purpureocillium lilacinum* może kolonizować nicienie korzeniowe (*Meloidogyne spp*), a tym samym niszczyć samice, ich jaja i cysty [Sharma i in., 2020]. Wykorzystuje również mechanizm antybiozy przeciwko grzybom *S. sclerotiorum*, antagonizując je, wytwarzając i wydzielając enzymy zewnątrzkomórkowe, które hamują rozwój czynnika białej pleśni *in vitro* [Elsherbiny i in., 2019]. Filtraty kultury grzybowej i ekstrakt z ściany komórkowej *Piriformospora indica* ograniczały infekcję *Heterodera schachtii* u *Arabidopsis* [Daneshkhah i in., 2013]. Podobnie grzyby *Aureubasidium pullulans* i *Candida orthopsilosis* wyizolowane z rośliny tekowej mogą pomagać w walce z chorobami wywoływanymi przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* w uprawach cytrusów [Sukmawati i in., 2021]. Inną grupą wyróżniających się endofitów są niepatogenne szczepy patogenów roślinnych. *Fusarium oxysporum* może wchodzić w interakcję z roślinami jako patogen, powodując gnicie lub więdnięcie korzeni. Jednak niektóre szczepy *F. oxysporum* mogą kolonizować rośliny jako endofity i chronić je przed chorobami grzybowymi wywoływanymi np. przez *Pythium ultimum* i *Verticillium dahliae* [De Lamo i Takken, 2020]. *Fusarium oxysporum* może również konkurować o składniki odżywcze korzeni co hamuje rozwój patogenów roślin grzybiczych [De Lamo i Takken, 2020; Fadiji i Babalola, 2020]. Antagonistyczne działanie grzybów endofitycznych sprzężone jest z syntezą związków bioaktywnych biorących udział w systemach obronnych [Rustamova i in., 2022], takich jak np. metabolity przeciwdrobnoustrojowe, przeciwgrzybicze i przeciwwirusowe, perfumoid, fomoenamid, dwusiarczek dimetylu, dibenzofuran, metanotiol, ketony, enzymy rozkładające b-1,3-glukan, b-1,4-glukan i b-glukozyd, chityna i β-glukany, β-1,3-glukanazy, chitynaza, celuloza, proteaza, enzymy hydrolizujące, fumonizyna, beuwerycyna itp., które przyczyniają się do zwalczania patogenów. Badania Sarrocco i Vannacci, [2018] wykazały potencjał nietoksycznych szczepów *Aspergillus flavus* w zwalczaniu mykotoksycznego *Aspergillus* w zbożach. Strategia unikania zanieczyszczenia aflatoksynami jeszcze przed zbiorami obejmuje wprowadzenie niepatogennych szczepów A. *flavus* w celu konkurowania i tłumienia toksycznych szczepów z rodzaju *Aspergillus* [Sarrocco i Vannacci, 2018]. Inne środki biokontroli były podobnie stosowane do kontrolowania toksycznych szczepów grzybów z rodzaju *Fusarium* w kukurydzy [Sarrocco i Vannacci, 2018; Sarrocco i in., 2019].

1.7.2.1. Komercyjne wykorzystanie grzybów endofitycznych w biokontroli

Rozwój badań nad wykorzystaniem endofitów w biologicznej ochronie roślin doprowadził do opracowania biopreparatów na bazie tych mikroorganizmów i wdrożenia ich do przemysłu. Stały się one alternatywą dla chemicznych pestycydów [(Le Cocq i in., 2017].

Na rynku dostępne są następujące preparaty zawierające grzyby endofityczne: BioEnsureR-Corn i BioEnsureR-Rice, które według informacji producenta mogą zwiększyć plony nawet o 80% w warunkach suszy i innych warunkach stresowych. Produkty te są w postaci płynnej, aplikowane na nasiona przed siewem. Wchodzą w symbiotyczną interakcję z nasionami jeszcze przed kiełkowaniem i wspomagają wzrost i rozwój roślin. Kolejnymi przykładami są preparaty, w skład których wchodzą grzyby z rodzaju *Epichloë*. Popularne są zwłaszcza w Australii, Nowej Zelandii, Stanach Zjednoczonych i Ameryce Południowej [Young i in., 2013; Johnson i in., 2013]. Stosowane są w celu zwiększenia odporności na stresy biotyczne i abiotyczne. Grzyby z rodzaju *Trichoderma* mogą być w tym samym czasie antagonistą patogena ale też symbiontem [Lorito i in., 2010]. Ze względu na te właściwości są tak szeroko wykorzystywane w preparatach. Szeroko rozpowszechnione, szczególnie w Azji, są także preparaty zawierające grzyby z rodzaju *Trichoderma* [Kumar i in., 2014; Cumagun, 2012]. Producentami preparatów są głównie firmy z Wietnamu, Stanów Zjednoczonych, Izraela, ale też Francji, Belgii, Danii, a także Polski. Polskim preparatem jest noszący nazwę Bip T, w skład którego wchodzi *T.viride* [Cumagun, 2012].

1.8. Grzyby endofityczne w pszenicy

Gatunki grzybów endofitycznych występujące w roślinach, jak już wcześniej wspomniano mogą być symbiontami lub patogenami, jednak rodzaj interakcji może mieć charakter czasowy i zmieniać się zależnie od warunków środowiskowych [Hardoim i in., 2015; Malcolm i in., 2013]. Coraz więcej badań sugeruje wpływ stresów biotycznych i abiotycznych, genotypu rośliny gospodarza, organu roślinnego na funkcje grzybów endofitycznych [Schulz i Boyle, 2005]. Aczkolwiek ekologiczna rola endofitów grzybowych w pszenicy jest nadal słabo poznana. Badania dotyczące rozmieszczenia i interakcji endofitów w pszenicy skupiały się głównie na grzybach z rodzaju *Epichloë* i *Neothypodium* [Card i in., 2014]. Brak jest jednak dostatecznej wiedzy na temat ekologicznej roli większości gatunków endofitycznych innych niż grzyby z rodzaju *Epichloë* i *Neothypodium*. Niemniej jednak udokumentowano występowanie endofitów w pszenicy, a także rozpoznano ich różne funkcje w roślinie, od symbiotycznych przez saprofityczne, po utajone patogeny. Do grzybów uważanych za patogenne zalicza się głównie gatunki z rodzajów *Fusarium, Botritis, Septoria, Sclerotinia, Rhizoctonia, Pyrenophora, Penicillium, Microdochium* czy *Epicoccum* [Comby i in., 2016; Comby i in., 2017; Taheri i in., 2016; Al-Sadi, 2021]. Natomiast grzyby mające symbiotyczny charakter lub korzystny wpływ na wzrost i rozwój pszenicy lub antagonistyczne działanie wobec jej patogenów, to grzyby z rodzaju *Trichoderma* i *Clonostachys*, czy *Chaetomium*

globosum [Vujanovic i in., 2012; Istifadah i McGee, 2006; Roberti i in., 2008]. Istnieją opinie, że gatunki powszechnie uważane za patogeny czy saprofity roślin, w tkankach pszenicy mogą pełnić zupełnie inną rolę. Podstawą poznania funkcji grzybów endofitycznych zasiedlających tkanki pszenicy jest określenie ich interakcji z rośliną, jak również interakcji z innymi mikroorganizmami w niej występującymi. Drugim, również ważnym kryterium jest rozpoznanie strategii „rekrutacji" mikroorganizmów i umożliwienie zasiedlenia swoich tkanek przez roślinę gospodarza.

Obecna wiedza na temat grzybów endofitycznych w pszenicy opiera się na badaniach prowadzonych w wąskim zakresie warunków doświadczalnych, w tym genotypów pszenicy, organów roślinnych, stadium rozwoju rośliny czy warunków środowiskowych. Comby i in. [2016] analizowali społeczność grzybów bytujących w organach dwóch odmian pszenicy w zależności od genotypu rośliny gospodarza, typu organu roślinnego (korzeń i organy naziemne) czy stadium rozwojowego rośliny. Ich wyniki wskazują na dużą bioróżnorodność grzybów bytujących w pszenicy, z endofitami i patogenami występującymi w badanych organach roślinnych. Wykazali wpływ organu i stadium rozwojowego na różnice społeczności grzybów w pszenicy. Larran i in. [2002] analizowali bioróżnorodność grzybów bytujących w liściach trzech odmian pszenicy. Wykazali oni wpływ stadium rozwojowego czy interakcji mikroorganizm-mikroorganizm na społeczność grzybów występujących w liściach. Późniejsze badania tego zespołu [(Larran i in., 2007] skupiły się na analizie składu grzybów endofitycznych w organach roślinnych (liście, łodygi, plewy i ziarna) pięciu odmian pszenicy zwyczajnej w pięciu fazach wzrostu. Wykazali oni zależność między organami roślinnymi, fazą wzrostu pszenicy czy genotypu a zmianami w społeczności grzybów.

Badania te opierały się jednak na metodach zależnych od hodowli, co wykluczało identyfikację gatunków biotroficznych i wolnorosnące, faworyzujących natomiast gatunki szybkorosnące [Alkan i in., 2021; Mahoney i in., 2017]. Rozwój technologii wysokoprzepustowych stworzył możliwość badań bioróżnorodności grzybów, także obligatoryjnych grzybów endofitycznych [Nicolaisen i in. 2014; Karlsson i in., 2014; Schlatter i in., 2019, Rossmann i in., 2020]. Metoda ta, pozwala jednak na klasyfikację grzybów endofitycznych do poziomu taksonomicznego jakim jest rodzaj [Toju i in., 2018]. Aby uzyskać kompletną wiedzę na temat mykobiomu endosfery roślin pszenicy należałoby zastosować zarówno metody wymagające hodowli jak i niezależne od hodowli. Poznanie funkcji endofitów jest jednak możliwe poprzez wyizolowanie go z tkanek roślinnych i dysponowanie jego kulturą na podłożach laboratoryjnych. Ważna jest klasyfikacja taksonomiczna do poziomu gatunku i określenie

właściwości danego szczepu w warunkach *in vitro*. Podejściem umożliwiającym rozpoznanie funkcji endofitu jest poddanie go interakcjom z roślinami pszenicy. W związku z niedostateczną wiedzą w tym temacie podjęto próbę charakterystyki grzybów endofitycznych bytujących w tkankach pszenicy. W oparciu o obecną wiedzę i badania wstępne [realizowane w ramach pracy magisterskiej, pt: Grzyby endofityczne zasiedlające pszenicę zwyczajną (*Triticum aestivum* L.) pod promotorstwem dr hab. Lidii Błaszczyk] sformułowano hipotezy i cele pracy doktorskiej.

II. HIPOTEZA

W pracy weryfikowano następujące hipotezy badawcze:

1) Skład gatunkowy grzybów zasiedlających endosferę pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) zależy od genotypu rośliny gospodarza, organu roślinnego i warunków uprawy.

2) Grzyby endofityczne pszenicy mają zdolność zarówno do horyzontalnej jak i wertykalnej transmisji w tkankach roślin.

3) Zmiany w składzie gatunkowym grzybów endofitycznych pszenicy mają wpływ na ekspresję jej genów.

III. CEL PRACY

Celem pracy doktorskiej było poznanie struktury i czynników determinujących skład gatunkowy grzybów zasiedlających endosferę pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) oraz zbadanie wpływu zmian zachodzących w mykobiomie endosfery pszenicy na ekspresję wybranych genów roślinnych.

Aby osiągnąć cel główny pracy, sformułowano następujące cele szczegółowe:

1) Określenie różnorodności i zmian w składzie społeczności grzybów wyizolowanych z endosfery roślin, uwarunkowanych odmianą i formą pszenicy, częścią rośliny i warunkami wzrostu.
2) Określenie sposobu przenoszenia się grzybów endofitycznych.
3) Zbadanie oddziaływań wyizolowanych grzybów endofitycznych na podstawie testów *in vitro*
4) Określenie wpływu grzybów endofitycznych na ekspresję wybranych genów pszenicy.

IV. MATERIAŁ i METODY

4.1. Materiał roślinny

Materiał roślinny stanowiły dwie formy pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.), jara – odmiany: Arabella, Bombona, Kandela, Rospuda i Rusałka oraz ozima – odmiany: Arkadia, Bamberka, Euforia, Legenda, Ostroga.

Ziarno pszenicy odmian Arkadia, Ostroga, Arabella, Bombona, Kandela uzyskano dzięki uprzejmości Danko, Hodowla Roślin Sp. z o.o. w Choryni. Ziarno pszenicy odmian Bamberka, Euforia, Rospuda i Rusałka uzyskano dzięki uprzejmości Hodowli Roślin Strzelce Grupa IHAR. Ziarno pszenicy odmiany Legenda uzyskano dzięki uprzejmości Poznańskiej Hodowli Roślin. Odmiany te zostały wybrane z uwagi na powszechne stosowanie ich w rolnictwie oraz według Centralnego Ośrodka Badań Odmian Roślin Uprawnych charakteryzują się umiarkowaną odpornością na choroby grzybowe (Tabela 1).

ARABELLA – odmiana pszenicy zwyczajnej, formy jarej, wpisana do Krajowego Rejestru w 2011 roku. Znajduje się w grupie a – jest jakościową odmianą chlebową. Cechuje się wysoką zawartością białka i glutenu, a także dobrą odpornością na wyleganie. Charakteryzuje się dobrą (w skali 9^o) odpornością na choroby grzybowe [DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o., 2021].

BOMBONA – odmiana pszenicy zwyczajnej, formy jarej, wpisana do Krajowego Rejestru w 2005 roku. Dzięki wysokim wartościom technologicznym i parametrom wypiekowym mąki zaliczana jest do elitarnej odmiany chlebowej (E). Charakteryzuje się również wysoką zawartością białka oraz glutenu, a także cechuje się dobrą odpornością na choroby grzybowe. [DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o., 2021]

KANDELA – odmiana pszenicy zwyczajnej, formy jarej, wpisana do Krajowego Rejestru w 2010 roku. Została zakwalifikowana jako jakościowa odmiana chlebowa (grupa A). Rośliny są średniej wielkości, wykazują małą odporność na wyleganie. Odmiana charakteryzuje się dużą odpornością na choroby powodowane przez mączniaka prawdziwego oraz rdzę brunatną, średnią odpornością na brunatną plamistość liści, septoriozę liści i plew oraz małą odpornością na fuzariozę kłosów i choroby podstawy źdźbła. [DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o., 2021]

ROSPUDA – odmiana pszenicy zwyczajnej, formy jarej. Rośliny są średniej wysokości, wykazują średnią odporność na wyleganie. Charakteryzują się także średnią zawartością białka i glutenu. Odmiana ma wysoką odporność na mączniaka prawdziwego oraz brunatną

plamistość liści, a także średnią odporność na septoriozę liści, plew, a także fuzariozę kłosów i chorób podstawy źdźbła. [Hodowla Roślin STRZELCE Sp. z o.o., 2021]

RUSAŁKA – jest odmianą pszenicy zwyczajnej, formy jarej, wpisana do Krajowego Rejestru w 2016 roku. Została zakwalifikowana jako jakościowa odmiana chlebowa (grupa A). Charakteryzuje się średnią odporność na choroby grzybowe. Rośliny tej odmiany są średniej wysokości, o przeciętnej odporności na wyleganie [Hodowla Roślin STRZELCE Sp. z o.o., 2021].

ARKADIA – jest wysokogatunkową (grupa A) odmianą pszenicy ozimej, wpisaną do Krajowego Rejestru w 2011 roku. Charakteryzuje się średnią zawartością białka i glutenu oraz dobrą odpornością na wyleganie. Cechuje się średnią odpornością na choroby grzybowe [DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o.].

BAMBERKA – odmiana pszenicy zwyczajnej, formy ozimej, wpisana do Krajowego Rejestru w 2009 roku. Według danych z COBORU odmiana ta charakteryzuje się średnią odpornością na większość chorób grzybowych, takich jak: mączniak prawdziwy, rdza brunatna, brunatna plamistość liści, septorioza liści i plew oraz choroby podstawy źdźbła i niską odpornością na fuzariozę kłosów. Rośliny są średniej wysokości o przeciętnej odporności na wyleganie. Charakteryzują się dużą zawartością białka i glutenu. [Hodowla Roślin STRZELCE Sp. z o.o., 2021]

EUFORIA – odmiana pszenicy zwyczajnej formy ozimej, wpisana do Krajowego Rejestru w 2018 roku. Została zakwalifikowana jako jakościowa odmiana chlebowa (grupa A). Charakteryzuje się dobrą odpornością na choroby grzybowe, szczególnie na rdzę żółtą i mączniaka prawdziwego. Rośliny są niskie, ale o dużej odporności na wyleganie oraz porastanie w kłosie. Charakteryzują się średnią zawartością białka oraz dużą ilością glutenu [Hodowla Roślin STRZELCE Sp. z o.o., 2021].

LEGENDA – odmiana pszenicy ozimej. Została wpisana do Krajowego Rejestru w 2005 roku, zakwalifikowano ją jako jakościową odmianę chlebową (grupa A). Według informacji zawartych na stronie producenta [Poznańska Hodowla Roślin, 2021] charakteryzuje się wysoką zawartością białka i glutenu. Jest odmianą o wysokiej odporności na choroby pszenicy.

OSTROGA – odmiana oścista pszenicy zwyczajnej. Została wpisana do Krajowego Rejestru w 2008 roku. Zakwalifikowana jako jakościowa odmiana chlebowa (grupa A).

Wyróżnia się wysoką zawartością białka i glutenu, a także bardzo dobrą odpornością na choroby grzybowe [DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o., 2021].

W Tabeli nr 1, przedstawiono porównanie badanych odmian pszenicy zwyczajnej według polowej oceny odporności na wybrane choroby grzybowe (skala 9-stopniowa), gdzie nota w przedziale 8-9 wskazuje, że odmianę można zaliczyć do odpornych, nota w przedziale 7-8 wskazuje, że odmiana jest średnio odporna, natomiast noty poniżej 7 wskazują, że odmiana jest nieodporna.

Tabela 1 Stopnie odporności na choroby u odmian pszenicy zwyczajnej wykorzystanych w badaniach (skala 9º)

	Arabella	Arkadia	Bamberka	Bombona	Euforia	Kandela	Legenda	Ostroga	Rospuda	Rusałka
Mączniak prawdziwy	8,1	6,3	7,7	7,5	8	8,2	7,8	7,2	7,7	7,3
Rdza brunatna	7,5	7,4	6,8	6,9	6,9	7,7	7,6	7,8	7,8	6,9
Rdza żółta	8,2	5,8	8,1	8	8,6	8,6	7	7,7		7,7
Septorioza liści	6,9	6,4	6,6	6,4	7,1	7,2	6,7	7	6,6	7,1
Septorioza plew	7,4	7,3	7,5	7,7	7,6	7,4	7,9	7,6		7,2
Fuzarioza kłosa	7	7,5	7,5	7,5	7,5	7,6	9	7,9	7,5	7,3
Choroby podstawy źdźbła	7,4	7,3	7,4	7,8	7,9	6,9	7,4	7,8	7,6	7,7
Brunatna plamistość liści	7,2	7,5	7,6	7,3	7,6	7,3	8	7,9		7,6

Opracowanie własne, na podstawie: Skrzypek A., 2018, 2019, 2020, 2021; Najewski A., 2018, 2019, 2020, 2021

Białe pola oznaczają, że nie znaleziono informacji, aby dana odmiana była badana pod kątem odporności na wymienione choroby grzybowe.

4.2. Metody

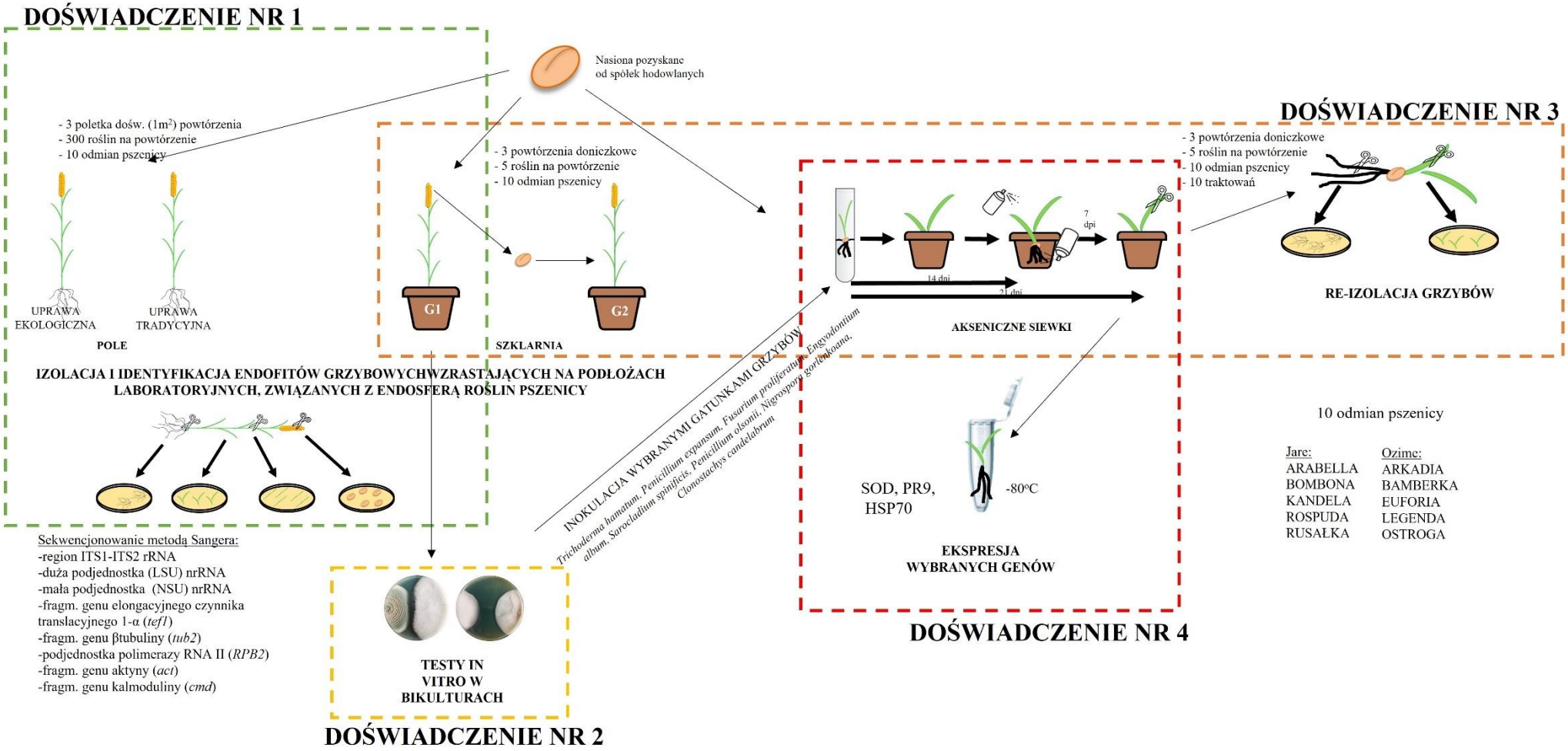
W przedstawionej pracy doktorskiej wykonano cztery doświadczenia ściśle ze sobą powiązane. Schemat tych doświadczeń przedstawiono na Rycinie nr 1. W Doświadczeniu nr 1 (zielona ramka na Rycinie nr 1) wyizolowano i zidentyfikowano grzyby pozyskane z organów nadziemnych i podziemnych pszenicy wzrastających w warunkach szklarniowych (generacja G1) oraz polowych.

Doświadczenie nr 2 (żółta ramka na Rycinie nr 1) polegało na przeprowadzeniu testów mikrobiologicznych (Rozdział 4) w bikulturach na podłożach agarowych z wykorzystaniem wszystkich gatunków grzybów endofitycznych, wyizolowanych w Doświadczeniu nr 1 z roślin (generacja G1) wzrastających w warunkach szklarniowych i zidentyfikowanych molekularnie.

Doświadczenie nr 3 (pomarańczowa ramka na Rycinie nr 1.) obejmowało analizę składu społeczności grzybów w dwóch generacjach roślin G1 i G2 wzrastających w warunkach szklarniowych oraz w aksenicznych siewkach pszenicy traktowanych wyselekcjonowanymi na podstawie Doświadczenia nr 2 szczepami grzybów endogennych.

Doświadczenie nr 4 (czerwona ramka na Rycinie 1) obejmowało inokulację aksenicznych siewek wybranymi (na podstawie wyników z Doświadczenia nr 2) szczepami grzybów

endofitycznych, mieszaniną tych grzybów oraz wodą destylowaną jako kontrolą, w celu określenia ich wpływu na ekspresję wybranych genów pszenicy.



Rycina 1 Schemat doświadczeń

4.1.1. Przygotowanie ziarniaków i warunki wzrostu roślin

A) Warunki szklarniowe

a) rośliny G1 i G2:

W warunkach szklarniowych uprawiano rośliny tzw. generacji G1 i G2. Rośliny generacji G1 uzyskano z ziarniaków otrzymanych bezpośrednio ze spółek hodowlanych, a rośliny generacji G2 uzyskano z ziarniaków roślin z generacji G1. W celu izolacji i identyfikacji grzybów związanych z endosferą roślin (generacja G1) pszenicy (Doświadczenie nr 1) oraz zaobserwowania wertykalnego sposobu przemieszczania się grzybów związanych z endosferą pszenicy (Doświadczenie nr 3) rośliny (generacja G1 i G2) były uprawiane w kontrolowanych warunkach w wyjałowionej glebie (gleba gliniasto-piaskowa zmieszana z piaskiem kwarcowym). Ziarniaki otrzymane bezpośrednio od spółek hodowlanych (Materiał roślinny, 1) jałowiono poprzez moczenie ziarniaków w 70% alkoholu etylowym [Avanator Performance Materials Poland S.A. – dawniej: POCH S.A., 44-101 Gliwice, ul. Sowińskiego, Polska] przez 30 s., a następnie w roztworze podchlorynu sodu [ACE Classic – Procter and Gamble DS. Polska Sp. z o.o., ul. Zabrniecka 20 03-872 Warszawa, Polska] przygotowanym przez zmieszanie z wodą destylowaną w stosunku 1:9, przez 2 min. Następnie ziarniaki przemywano kilkakrotnie wodą destylowaną w celu usunięcia resztek alkoholu i podchlorynu sodu. Tak przygotowane ziarniaki umieszczano w jałowych warunkach na szkiełkach Petriego o średnicy 15 cm, wyłożonych nasączoną wodą bibułą filtracyjną, zgodnie z procedurą Djonowić i in. [2006]. Po 3 dniach inkubacji w temperaturze pokojowej siewki o podobnej długości korzeni i liści umieszczano w dwuściennych doniczkach o średnicy 25 cm i wysokości 35 cm, w wyjałowionej glebie. Rośliny uprawiane były w szklarni w kontrolowanych warunkach: fotoperiod 12h/12h dzień/noc, temperatura 25 ± 3°C. Wilgotność była utrzymywana na poziomie 40% w okresach światła i ciemności. Po 14 dniach inkubacji w podanych warunkach, siewki ozimych odmian pszenicy poddane zostały jaryzacji w temperaturze 4°C przez 8 tygodni w warunkach: fotoperiod 16/8 h dzień/noc. Po tym czasie wszystkie sadzonki (odmian form jarych oraz ozimych) były uprawione w temperaturze dzień/noc 22/18°C z fotoperiodem 16/8 h (dzień/noc). Doświadczenie w warunkach laboratoryjnych zorganizowano w całkowicie zrandomizowanym systemie: 10 odmian x trzy powtórzenia doniczkowe x pięć roślin na powtórzenie/doniczkę.

b) akseniczne siewki uzyskane przez ekstrakcję zarodka

W celu uzyskania aksenicznych siewek ziarniaki pszenicy sterylizowano powierzchniowo 70% alkoholem etylowym [Avanator Performance Materials Poland S.A. – dawniej: POCH S.A., 44-101 Gliwice, ul. Sowińskiego, Polska], a następnie 0,5% podchlorynem sodu [ACE Classic – Procter and Gamble DS. Polska Sp. z o.o., ul. Zabrniecka 20 03-872 Warszawa, Polska] i kilkukrotnie przepłukano w wodzie destylowanej. Przed ekstrakcją zarodka ziarniaki moczono w wodzie przez całą noc w temperaturze 4^{o}C. Wysterylizowane powierzchniowo ziarna pszenicy zostały wypłukane w świeżej wodzie destylowanej, a zarodek został wyseparowany z każdego ziarniaka przez oddzielenie go od bielma. Wyseparowany zarodek został umieszczony w 95% etanolu [Avanator Performance Materials Poland S.A. – dawniej: POCH S.A., 44-101 Gliwice, ul. Sowińskiego, Polska], a następnie dokładnie wypłukany w wodzie destylowanej. Takie zarodki hodowane były na pożywce Gamborga (B5) [Gamborg i in., 1968]. Po 7 dniach inkubacji w temperaturze pokojowej, siewki zostały przesadzone do doniczek doświadczalnych o wymiarach 3x3x12 cm wypełnionych sterylnym piaskiem kwarcowym i uprawiane w fitotronie w warunkach podanych jak powyżej (2.1.A.a).

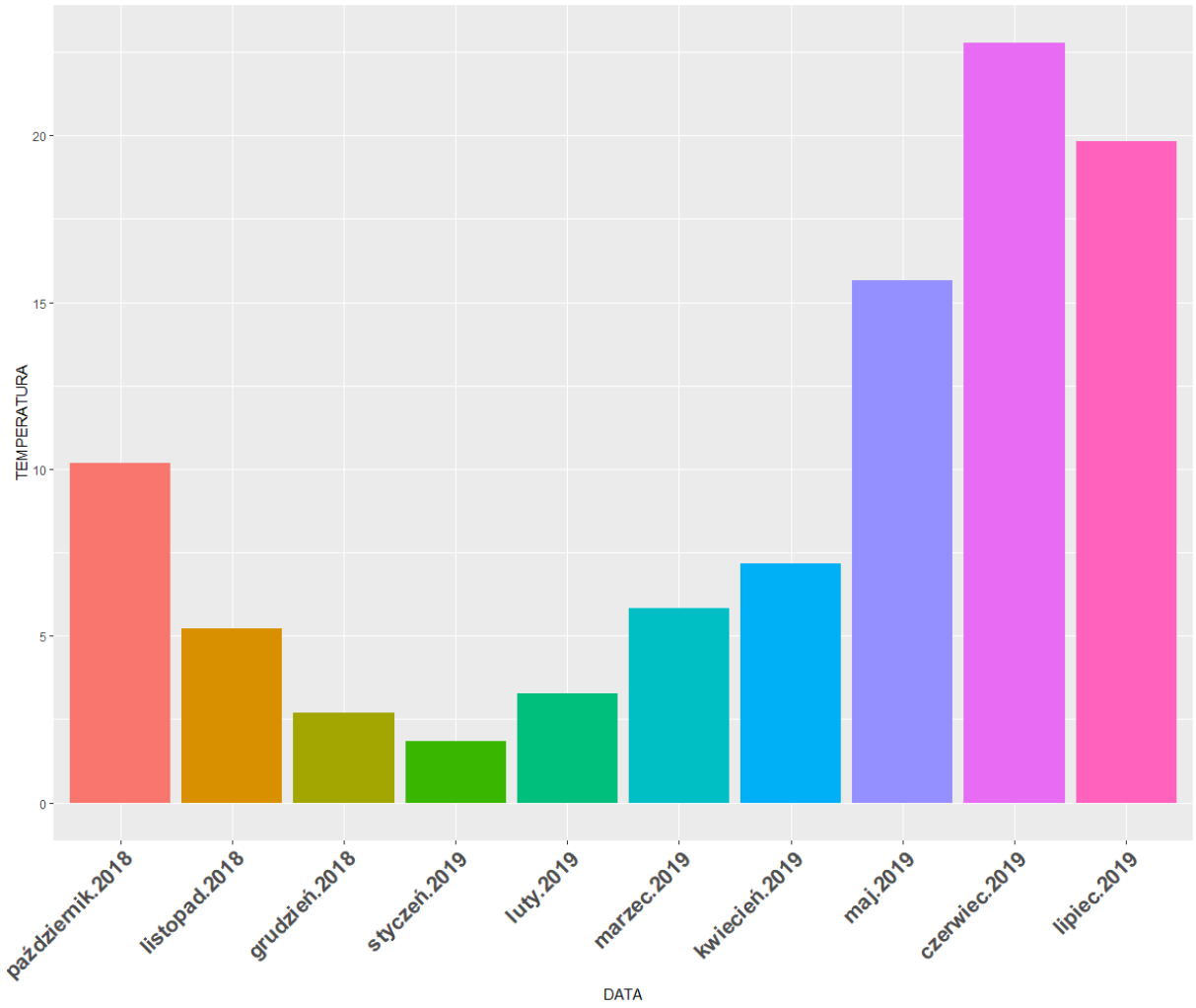
Doświadczenia z udziałem aksenicznych siewek prowadzono w całkowicie zrandomizowanym systemie: 10 odmian pszenicy x dziesięć traktowań (8 różnych gatunków grzybów wyselekcjonowanych na podstawie Doświadczenia nr 2, mieszanina tych 8 gatunków grzybów, sterylna woda destylowana) x trzy powtórzenia doniczkowe x pięć roślin na powtórzenie/doniczkę.

B) Warunki polowe

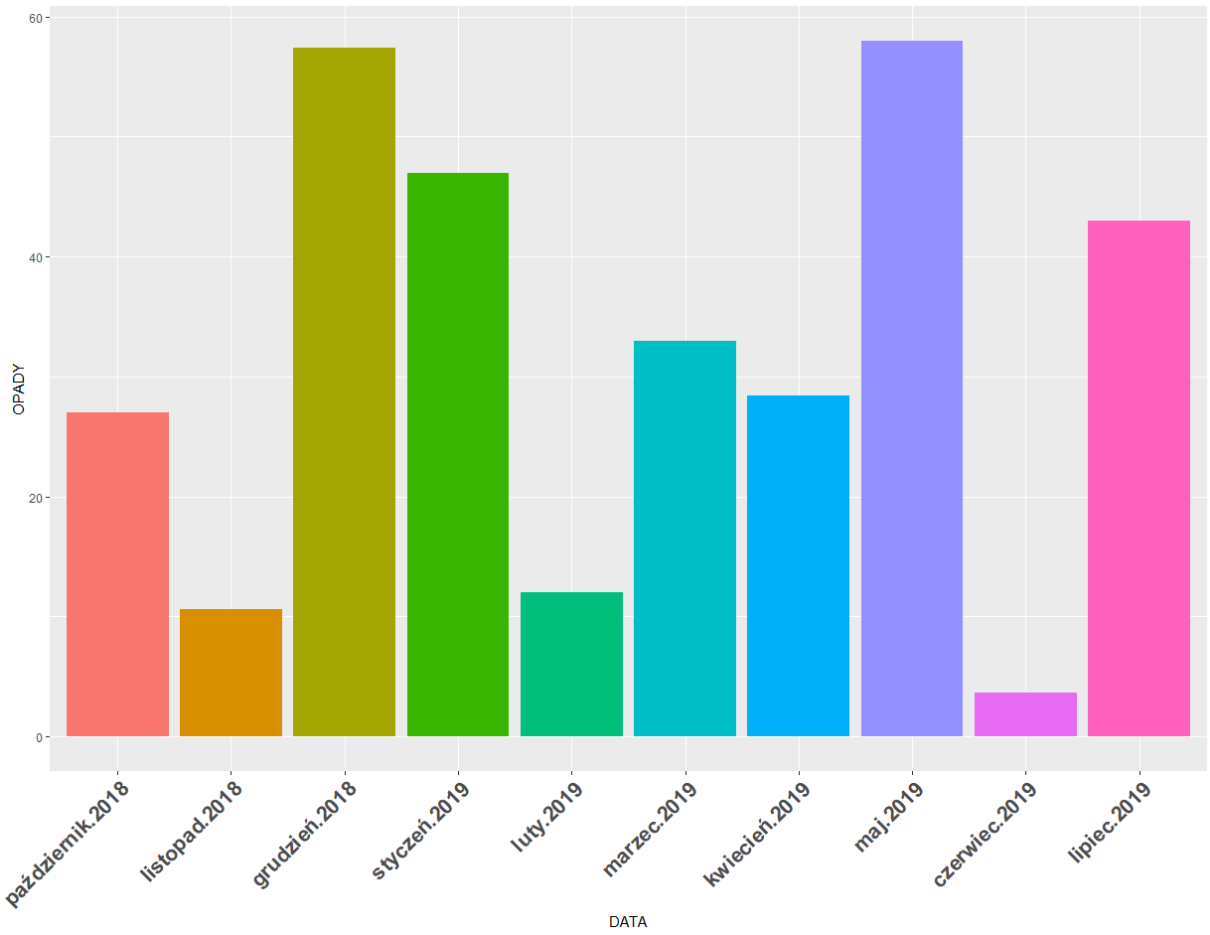
Rośliny wykorzystane w Doświadczeniu nr 1 były uprawiane w sezonie 2018/2019 w warunkach polowych w Cerekwicy (zachodnia Polska; współrzędne GPS: N 52.521012, E 16.692005) na polach doświadczalnych należących do Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu. Do doświadczenia wykorzystano ziarna pozyskane bezpośrednio od spółek hodowlanych. Doświadczenie w warunkach polowych zostało przeprowadzone w sposób zrandomizowany, z dwoma zmodyfikowanymi strategiami uprawy [tradycyjna – stosowano nawożenie NPK (azot-fosfor-potas) i herbicydy oraz ekologiczna – bez nawożenia i środków ochrony roślin; w obu strategiach nie stosowano fungicydów], dziesięcioma odmianami pszenicy, trzema poletkami (jedno poletko =1m^2)/odmianę oraz trzystoma roślinami na powtórzenie.

4.2. Warunki meteorologiczne w trakcie prowadzenia badań

Warunki pogodowe w latach 2018-2019, w których prowadzone były doświadczenia zostały zapisane na podstawie wykonanych pomiarów w stacji meteorologicznej położonej na polu doświadczalnym Instytutu Genetyki Roślin w Cerekwicy oraz w stacji meteorologicznej Zakładu Doświadczalno-Dydaktycznego Gorzyń filia w Złotnikach (miesiące luty oraz marzec 2019). Średnie temperatury powietrza oraz opadów zostały przedstawione poniżej, na Rycinie nr 2 oraz Rycinie nr 3.



Rycina 2 Średnie temperatury powietrza [°C] w latach 2018-2019 w Cerekwicy.



Rycina 3 Sumy opadów atmosferycznych [mm] w latach 2018-2019 w Cerekwicy.

Poniżej przedstawiono charakterystykę poszczególnych miesięcy, w których prowadzone było doświadczenie, pod względem średniej temperatury powietrza oraz sumy opadów atmosferycznych. Pomimo, że optymalnym terminem wysiewu pszenicy ozimej jest druga połowa września, doświadczenie zostało założone w październiku, dlatego pominięto w analizie dane dotyczące temperatury powietrza oraz sumy opadów w miesiącu wrześniu.

Październik – temperatura w tym miesiącu wynosiła 10°C, a suma opadów wynosiła 27 mm. Warunki meteorologiczne były optymalne dla siewu pszenicy ozimej.

Listopad – w tym miesiącu temperatura spadła prawie o połowę i wynosiła 5,22°C, również suma opadów, w porównaniu z miesiącem poprzednim zmalała i wynosiła 10,6 mm.

Grudzień – średnia temperatura w tym miesiącu wynosiła 2,69°C i była niższa o 2,53°C w porównaniu z temperaturą w listopadzie. Jednakże suma opadów była wyższa aż o 46,8 mm w porównaniu z miesiącem poprzednim i wynosiła 57,4 mm.

Styczeń – średnia temperatura nieznacznie spadła w porównaniu z grudniem i wynosiła 1,83^{o}C, również suma opadów nieznacznie zmalała i wynosiła 47 mm.

Luty – był to miesiąc, w którym temperatura wzrosła o 1,43°C i wynosiła 3,26°C. Natomiast suma opadów znacząco zmalała i wynosiła jedynie 12 mm.

Marzec -miesiąc ten był sprzyjający dla siewu pszenicy jarej, gdyż średnia temperatura powietrza wynosiła 5,82^{o}C. Również suma opadów kształtowała się na zadowalającym poziomie, wynosząc 33 mm.

Kwiecień – średnia temperatura wzrosła o 1,3^{o}C i wynosiła 7,16^{o}C. Sprzyjało to wschodom pszenicy jarej, ale też dalszemu rozwojowi pszenicy ozimej. Suma opadów nieznacznie się zmniejszyła i wynosiła 28,4 mm.

Maj – średnia temperatura powietrza zwiększyła się dwukrotnie i wynosiła 15,67^{o}C, a suma opadów w tym miesiącu również zwiększyła się dwukrotnie, wynosząc 58 mm. Były to warunki sprzyjające kształtowaniu się liścia flagowego.

Czerwiec – temperatura powietrza znacząco wzrosła do 22,77^{o}C, osiągając najwyższą wartość w okresie prowadzonego doświadczenia. Bardzo mała suma opadów, na poziomie 3,6 mm, spowodowało wykształcenie się niepełnowartościowego ziarna.

Lipiec – średnia temperatura powietrza w ostatnim miesiącu doświadczenia kształtowała się na poziomie 19,83^{o}C, była nieznacznie niższa w porównaniu do średniej temperatury w miesiącu poprzednim. Natomiast suma opadów była o 39,4 mm wyższa niż w miesiącu czerwcu.

4.3. Zbiór materiału roślinnego.

a) Rośliny uprawiane w warunkach szklarniowych oraz polowych

Rośliny (warunki polowe: 5 roślin/odmiana/powtórzenie/strategia uprawy; warunki kontrolowane: 5 roślin (generacja G1 lub G2)/odmiana/powtórzenie) zbierane były w stadium dojrzałości mlecznej ziarniaka (BBCH 75-77). Natomiast kłosy z generacji G1 z dojrzałymi nasionami, które posłużyły jako materiał siewny dla generacji G2 zostały zebrane w późnym stadium dojrzewania (BBCH 89).

Świeżo zebrane rośliny zostały przeniesione do laboratorium i były przechowywane w temp. 4^{o}C maksymalnie do 24h przed dalszym przetwarzaniem. Zebrane nasiona oraz kłosy z dojrzałymi nasionami były przechowywane w papierowych torebkach w temperaturze pokojowej do czasu ich obróbki (Doświadczenie nr 3).

b) Akseniczne siewki uprawiane w fitotronach

21-dniowe siewki (5 roślin/odmiana/traktowanie/powtórzenie) uprawiane w warunkach *in vitro* w fitotronach zostały zebrane, oczyszczone z piasku kwarcowego i wypłukane w destylowanej wodzie. Materiał roślinny podzielono na kilka części: po 50 mg korzeni i liści (łącznie 100 mg) z 5 siewek umieszczono w 2ml próbówkach typu Eppendorf i zamrożono w ciekłym azocie, następnie próby przechowywano w -80^{o}C do czasu dalszych badań (Doświadczenie nr 4); fragmenty korzeni oraz liści z 5 siewek umieszczono w 50ml próbówkach typu falkon i przechowywano je przez maksymalnie 24h w temperaturze 4^{o}C do czasu re-izolacji szczepów grzybów, którymi traktowano rośliny (Doświadczenie nr 3).

4.4. Przygotowanie inokulum i zaszczepianie aksenicznych siewek

Tabela nr 2 przedstawia listę szczepów wykorzystanych w Doświadczeniu nr 2 (rozdział 4), natomiast Tabela nr 3 listę izolatów wykorzystanych w Doświadczeniu nr 3 i 4 (z wykorzystaniem aksenicznych siewek (rozdział 2.5.b oraz rozdział 5).

Tabela 2 Izolaty grzybów endofitycznych wykorzystane jako inokulum w testach mikrobiologicznych – bikultury.

Numer kolekcyjny (szczep)	Nazwa gatunkowa
E80	*Trichoderma viride*
E191	*Trichoderma koningii*
E81	*Trichoderma hamatum*
E69_1_1	*Penicillium olsonii*
E193	*Penicillium expansum*
E106	*Penicillium crustosum*
E11	*Sarocladium spinificis*
E22	*Sarocladium strictum*
E202	*Fusarium proliferatum*
E35	*Engyodontium album*
E83	*Clonostachys candelabrum*
E208	*Nigrospora gorlenkoana*

Tabela 3 Izolaty grzybów endofitycznych wykorzystane do inokulacji aksenicznych siewek.

Numer kolekcyjny (szczep)	Nazwa gatunkowa
E11	*Sarocladium spinificis*
E35	*Engyodontium album*
E69_1_1	*Penicillium olsonii*
E81	*Trichoderma hamatum*
E83	*Clonostachys candelabrum*
E193	*Penicillium expansum*
E202	*Fusarium proliferatum*
E208	*Nigrospora gorlenkoana*

Skolekcjonowane izolaty grzybów przechowywane były w 2 ml próbówkach kriogenicznych na podłożu stałym SNA (ang. *synthetic nutrient-poor agar*; Tabela nr 4) [Nirenberg, 1976] w 4^{o}C. w celu ich ożywienia, czyste kultury endogennych grzybów były przeszczepiane ze skosów wyjściowych na szalki Petriego o średnicy 90 mm, na podłoże stałe PDA (ang. *potato dextrose agar*, Tabela nr 5). Szalki następnie inkubowano 7 dni w inkubatorze [Sanyo MIR-254, SanLab, Polska], w stałych warunkach świetlnych 12h/12h dzień/noc i w temperaturze 22^{o}C. Do przygotowania inokulum w Doświadczeniu nr 2 – bikultury (Tabela nr 2) oraz Doświadczeniu nr 3 i 4 (Tabela nr 3) wykorzystano 7-dniowe kultury.

Tabela 4 Skład stałego podłoża mikrobiologicznego SNA (ang. *Synthetic nutrient-poor agar*) [Nirenberg, 1976]

Składnik	Ilość składnika/litr
Glukoza	0,2g
Sacharoza	0,2g
KH_2PO_4	1g
KNO_3	1g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5g
KCl	0,5g
agar	15g

Tabela 5 Skład stałego podłoża mikrobiologicznego PDA (ang. *Potato Dextrose Agar*)

Składnik	Ilość składnika/litr
PDA (Oxoid)	39g
Agar (Sigma)	10g

Formy inokulacji:

a) inokulacja doglebowa

14-dniowe akseniczne siewki rosnące jak opisano w podrozdziale 2.1.A.b zaszczepiano wybranym izolatem grzyba lub mieszaniną izolatów wszystkich badanych gatunków (Tabela 3) umieszczając krążek agarowy o średnicy 0,8 cm, wycięty za pomocą korkoboru z 7-dniowej kultury, na głębokość ok 0,5 cm przy strefie korzeniowej każdej siewki. w przypadku badania wpływu wszystkich wybranych grzybów na roślinę w pobliżu bryły korzeniowej umieszczono krążki wycięte z kultur wszystkich badanych gatunków grzybów.

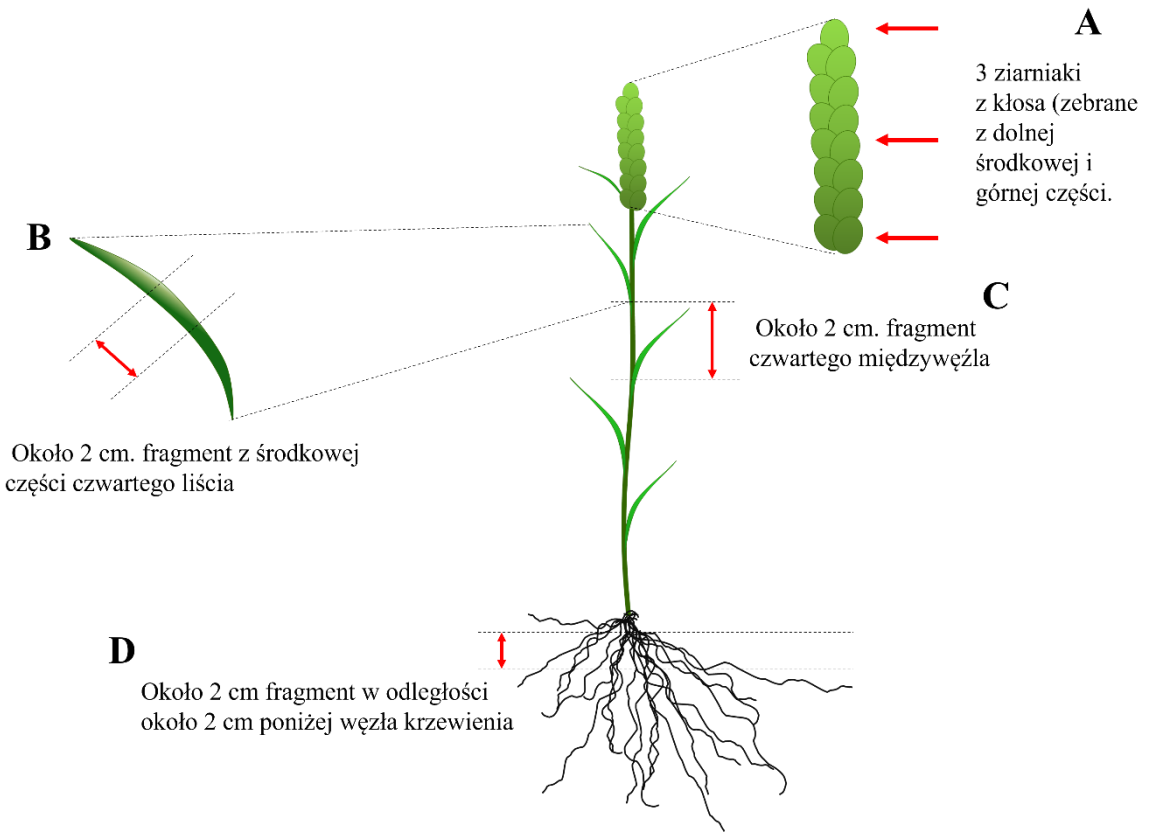
b) inokulacja części nadziemnych

liście 14-dniowych siewek pszenicy zostały zainokulowane poprzez oprysk zawiesiną zarodników grzybów otrzymaną przez zmieszanie 10 ml wody destylowanej z 1ml Triton X-100 (Sigma Aldrich, USA) i 3 krążkami agarowymi o średnicy 0,8 cm wyciętymi z 7-dniowej kultury grzybowej, na podstawie zmodyfikowanej procedury zaproponowanej przez Basińska – Barczak i in. [2020]. Podobnie jak w przypadku korzeni, w celu sprawdzenia wpływu wszystkich badanych gatunków grzybów sporządzono mieszaninę, w skład której oprócz wody destylowanej oraz Triton X-100 (Sigma Aldrich, USA) wchodziły 3 krążki agarowe wycięte z 7-dniowej kultury każdego izolatu grzyba (Doświadczenie nr 3 oraz nr 4).

4.5. Izolacja grzybów z endosfery części nadziemnych i podziemnych roślin pszenicy.

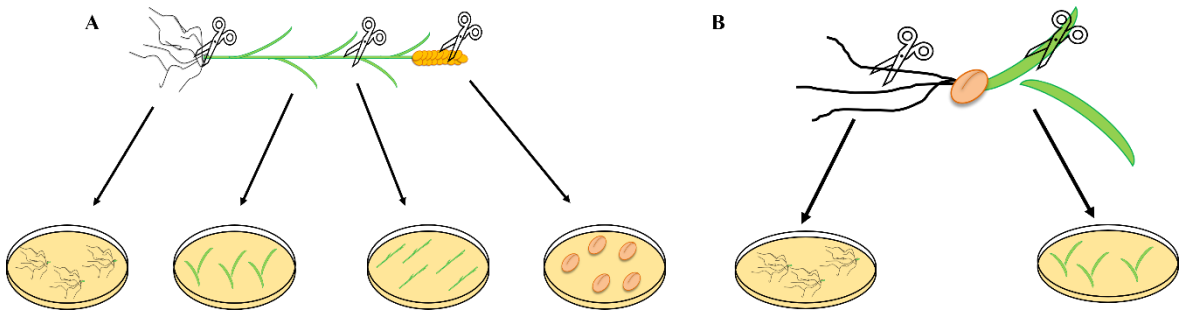
a) Rośliny uprawiane w warunkach szklarniowych oraz polowych

Rośliny z generacji G1 i G2 wzrastające w warunkach szklarniowych oraz rośliny uprawiane w warunkach polowych poddano przygotowaniu wstępnemu.



Rycina 4 Schemat przedstawiający fragmenty rośliny wykorzystane do izolacji grzybów endofitycznych.

Powierzchnię korzeni oczyszczono mechanicznie przy użyciu szczotki z pozostałości gleby. Do analiz brano 3 ziarniaki z kłosa (Rycina 4A), fragment z środkowej części czwartego liścia, fragment czwartego międzywęźla (Rycina 4C) oraz fragment korzeni w odległości około 2 cm poniżej węzła krzewienia (Rycina 4D). Następnie poszczególne części rośliny (korzenie, łodygę, liście) pocięto na około 2-centrymetrowe skrawki przy użyciu sterylnego skalpela i poddano je jałowieniu. z ziarniaków usunięto okrywę nasienną przed jałowieniem. Fragmenty roślin płukano w 70% alkoholu etylowym [Avanator Performance Materials Poland S.A. – dawniej: POCH S.A., 44-101 Gliwice, ul. Sowińskiego, Polska] przez 30 sekund, następnie w 0,5% podchlorynie sodu [ACE Classic – Procter and Gamble DS. Polska Sp. z o.o., ul. Zabrniecka 20 03-872 Warszawa, Polska] przez 2 min. Tak oczyszczone fragmenty kilkukrotnie przemywano wodą destylowaną, by usunąć pozostałości alkoholu etylowego i podchlorynu sodu.



Rycina 5 Izolacja grzybów endofitycznych z wyjałowionych części roślin pszenicy - schemat

Następnie wyjałowione skrawki wszystkich części roślin oraz ziarniaki umieszczono na agarze ziemniaczano-dekstrozowym (PDA) [Oxoid™ Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA] z dodatkiem 50 µl ampicyliny [Merck Life Science Sp.z.o.o., Darmstadt, Germany] o stężeniu 100mg/ml na płytkach Petriego o średnicy 90 mm (Rycina 5A), przy zachowaniu warunków sterylnych. Ziarniaki przed wyłożeniem na podłoże agarowe były przecinane wzdłuż płaszczyzny osiowej i umieszczane wewnętrzną stroną ziarniaka w kierunku podłoża.

Hodowlę prowadzono w inkubatorze [Sanyo MIR-254, SanLab, Polska] w temperaturze 21°C i przy fotoperiodyzmie 12/12 (dzień/noc) do czasu zaobserwowania wzrostu kultur grzybowych, które następnie pasażowano kilkukrotnie na płytki Petriego o średnicy 90 mm z podłożem PDA w celu uzyskania monokultur. Grzybnię zbierano do 1,5 ml próbówek typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu izolacji DNA.

Uzyskane izolaty grzybów kolekcjonowano poprzez inokulację w warunkach sterylnych skosów z podłożem PDA oraz SNA zestalonych w 2 ml próbówkach kriogenicznych. Utworzono dwie kopie kolekcji, gdzie jedna jest przechowywana w temperaturze -80°C - w tym celu, po kilkudniowej inkubacji w temperaturze 21°C do probówek kriogenicznych dodawano 10% roztwór glicerolu w wodzie (v/v), a druga kopia kolekcji grzybów przechowywana jest w 4°C.

b) Siewki akseniczne

Podczas re-izolacji grzybów endofitycznych z aksenicznych siewek, części korzenia oraz liści umieszczano na podłożu PDA na płytkach Petriego o średnicy 90 mm, pomijając etap wcześniejszego jałowienia (Rycina 5B). Hodowlę prowadzono w inkubatorze [Sanyo MIR-254, SanLab, Polska] w temperaturze 21°C i fotoperiodyzmie 12/12 (dzień/noc) do czasu zaobserwowania wzrostu kultur grzybowych, które następnie kilkukrotnie pasażowano na płytki Petriego o średnicy 90 mm z podłożem PDA w celu uzyskania monokultur. Grzybnię

zbierano do 1,5 ml próbówek typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu izolacji DNA.

Uzyskane izolaty grzybów kolekcjonowano poprzez inokulację w warunkach sterylnych skosów z podłożem PDA oraz SNA zestalonych w 2 ml próbówkach kriogenicznych. Utworzono dwie kopie kolekcji, gdzie jedna jest przechowywana w temperaturze -80°C - w tym celu, po kilkudniowej inkubacji w temperaturze 21°C do probówek kriogenicznych dodawano 10% roztwór glicerolu w wodzie (v/v), a druga kopia kolekcji grzybów przechowywana jest w 4°C.

4.6. Identyfikacja molekularna

Identyfikacja molekularna opierała się na analizie sekwencji wybranych markerów filogenetycznych: regionu ITS1 i ITS2 rDNA [White i in., 1990] dużej podjednostki (LSU) nrRNA [Vilgalys i Hester, 1990] oraz małej podjednostki (SSU) nrRNA [White i in., 1990], fragmentu genu elongacyjnego czynnika translacyjnego 1-α (*tef1*) [Roger i in., 1999], fragmentu genu β-tubuliny (*tub2*) [Edlind i in., 1996], fragmentu genu aktyny (*act*) [Drouin i in., 1995] oraz fragmentu genu kalmoduliny (*cmd*) [Hong i in., 2005].

4.6.1. Izolacja genomowego DNA

Materiał do izolacji genomowego DNA stanowiła grzybnia uzyskana z hodowli na płytkach Petriego o średnicy 90 mm z PDA, przechowywana w 1,5 ml próbówkach typu Eppendorf w temperaturze -20°C. Izolację przeprowadzono zgodnie z protokołem zamieszczonym przez producenta Wizard® Genomic DNA Purification Kit [Promega, Madison, WI, USA] z modyfikacjami. Zebraną wcześniej grzybnię zamrożono w ciekłym azocie, a następnie roztarto przy pomocy pistla z tworzywa sztucznego. Uzyskany homogenat zawieszono w 600 µl roztworu do lizy i worteksowano przez 1-3 sekundy. Próby umieszczono w łaźni wodnej i inkubowano w 65°C przez 15 minut. Po inkubacji próbki pozostawiono w temperaturze pokojowej na okres 5 minut. Do próbówek dodano 200 µl roztworu do strącania białek, a następnie próby zworteksowano i wirowano przy 10 500 rpm przez 3 min. Supernatant zawierający DNA przeniesiono do nowych, 1,5 ml próbówek typu Eppendorf, do których dodano 600 µl isopropanolu [Merck Life Science Sp.z.o.o., Darmstadt, Germany] o temperaturze pokojowej. Próby kilkukrotnie mieszano przez odwracanie próbówek, które następnie wirowano przy 10 500 rpm przez 1 min w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu wirowania, ostrożnie zlano supernatant, a do osadu dodano 600 µl 70% alkoholu etylowego [Avanator Performance Materials Poland S.A. – dawniej: POCH S.A., 44-101 Gliwice, ul. Sowińskiego, Polska] o temperaturze pokojowej. Probówki kilkakrotnie odwracano w celu

przemycia DNA. Próby ponownie zwirowano przy 10 500 rpm przez 1 min w temperaturze pokojowej. Ostrożnie usunięto cały etanol używając pipety automatycznej. Osad suszono przez 15 minut poprzez umieszczenie odwróconych próbówek na czystym papierze absorbującym. Dodano 100 µl roztworu do rehydratacji DNA. Próby inkubowano przez całą noc w temperaturze 4^{o}C. Roztwór DNA przechowywano w -20^{o}C.

4.6.2. Reakcja amplifikacji

Regiony ITS1 i ITS2 klastra genów rDNA były amplifikowane przy użyciu starterów ITS1F i ITS4 [White i in., 1990]. Fragment DNA kodujący dużą podjednostkę (LSU) nrRNA był amplifikowany przy użyciu starterów LROR i LR6 [Vilgalys i in., 1990; Rehner i Samuels, 1995], a kodujący małą podjednostkę (SSU) nrRNA - przy użyciu starterów NS1 i NS4 [White i in., 1990]. Fragment genu *tef1* amplifikowany był przy użyciu starterów ef1 i ef2 [(Geiser i in., 2004; Maciá-Vicente i in., 2008] i starterów Ef728M i Tef1R [Carbone i Kohn, 1999; Kullnig-Gradinger i in., 2002] oraz starterów Ef1-1018f i Ef1-1620R [Stielow i in., 2015]. Fragment genu kodującego β-tubulinę był amplifikowany przy użyciu starterów Bt2a i Bt2b [Glass i Donaldson, 1995]. Fragment genu kodującego aktynę był amplifikowany przy użyciu starterów act-1F oraz act-4R [Voigt i Wöstemeyer, 2000], a fragment genu kodującego kalmodulinę był amplifikowany przy użyciu starterów CMD5 i CMD6 [Hong i in., 2005]. Lista wykorzystanych w badaniach par starterów została przedstawiona w Tabeli nr 6.

Reakcję PCR prowadzono w objętości 25 µl w termocyklerze BioRad C100 Thermal Cykler [BioRad, Hercules, Kalifornia, USA], gdzie matrycę stanowiło genomowe DNA wyizolowane z grzybni. w Tabeli nr 7, zamieszczono skład mieszaniny reakcyjnej. Warunki temperaturowe reakcji amplifikacji poszczególnych fragmentów genów oraz regionów zostały opisane w Tabeli nr 8.

Tabela 6 Startery wykorzystane do identyfikacji molekularnej grzybów endofitycznych

Nazwa (locus)	Długość amplikonu	Starter	Sekwencja startera 5'-3'	Referencje
Internal Transcribed Spacer (ITS) region rRNA	~450-800 pz	ITS1F	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	White i in., 1990
		ITS4R	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	
Duża podjednostka (LSU) rRNA	~1200 pz	LROR	ACC CGC TGA ACT TAA GC	Vilgalys i in., 1990; Rehner i in., 1995
		LR6	CGC CAG TTC TGC TTA CC	
Mała podjednostka (SSU) rRNA	~1200 pz	NS1	GTA GTC ATA TGC TTG TCT C	White i in., 1990
		NS4	CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG	
Elongacyjny czynnik transkrypcyjny 1-α	~700 pz	ef1	ATG GGT AAG GA(A/G) GAC AAG AC	Geiser i in., 2004; Maciá-Vicente i in., 2008
		ef2	GGA (G/A)GT ACC AGT (G/C)AT CAT GTT	
		Ef728M	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	Carbone i in., 1999; Kullnig-Gradinger i in., 2002
		Tef1R	GCCATCCTTGGAGATACCAGC	
	~600 pz	Ef1-1018F	GAY TTC ATC AAG AAC ATG AT	Stielow i in., 2015
		Ef1-1620R	GAC GTT GAA DCC RAC RTT GTC	
β-tubulina	~500 pz	Bt2a	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	Glass i in., 1995
		Bt2b	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	
Kalmodulina	~580 pz	CMD5	CCG AGT ACA AGG AGG CCT TC	Hong i in., 2005
		CMD6	CCG ATA GAG GTC ATA ACG TGG	
Aktyna	~370 pz	Act-1F	TGGGACGATATGGANAANATCTGGCA	Voigt i Wostemeyer, 2000
		Act-4R	TCNTCGTATNCTNGCTNNGANATCCACAT	

Tabela 7 Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji amplifikacji.

Składnik	Stężenie wyjściowe	Objętość dla jednej próby	
	Dla starterów:	ITS1F/ITS4; LROR/LR6; bt2a/bt2b; ef1018f/ef1620R; ef1/ef2;	Act; CMD5/CMD6
Bufor reakcyjny PCR	10x	2,5 µl	2,5 µl
Mieszanina dNTP	2,5 µM	1,2 µl	2 µl
Starter 1 (forward)	100 µM	0,2 µl	0,1 µl
Starter 2 (rewers)	100 µM	0,2 µl	0,1 µl
Woda		20,7 µl	19,5 µl
Polimeraza Taq	2 U/µl	0,2 µl	0,25 µl
Matryca	50ng/µl	1 µl	1 µl

Tabela 8 Warunki temperaturowe reakcji amplifikacji

Nazwa regionu/genu	Region ITS1 i ITS2 rDNA		Duża podjednostka (LSU) rRNA		Mała podjednostka (SSU) rRNA		Elongacyjny czynnik translacyjny 1-α						β-tubulina		Kalmodulina		Aktyna	
Startery	ITS1 F/ITS 4		LROR/LR6		NS1/NS4		ef1/ef2		Ef1-1018f/ Ef1-1620r		Ef728M/ Tef1R		Bt2a/Bt2b		CMD5/CMD6		Actin512	
Denaturacja wstępna	95ºC 3 min	1x	95ºC 3 min	1x	95 ºC 5 min	1x	95 ºC 3 min	1x	95 ºC 2min	1x	95ºC 3 min	1x	94ºC 3min	1x	95ºC 3min	1x	95ºC 3min	1x
									66ºC-56ºC touchdown	9x								
Denaturacja	95 ºC 45s	35x	95 ºC 45s	35x	95 ºC 30s	35x	95 ºC 30s	36x	95 ºC 30 s	36 x	95ºC 30s	35x	94ºC 45s	34x	95 ºC 30s	35x	95 ºC 30s	35x
Wiązanie starterów	58 ºC 45s		58 ºC 45s		52 ºC 30s		57 ºC 30s		56 ºC 1min		58ºC 30s		58ºC 45s		55 ºC 30s		55 ºC 30s	
Synteza	72 ºC 1 min		72 ºC 1 min		72 ºC 1 min		72 ºC 1 min		72 ºC 1min		72ºC 1 min		72ºC 1min		72ºC 1min		72ºC 1min	
Synteza końcowa	72 ºC 5 min	1x	72 ºC 5 min	1x	72 ºC 8 min	1x	72 ºC 5 min	1x	72ºC 10 min	1x	72ºC 10 min	1x	72ºC 5min	1x	72 ºC 10min	1x	72 ºC 10min	1x
Przechowywanie	4ºC ∞		4ºC ∞		4ºC ∞		4ºC ∞		4ºC ∞		4ºC ∞		4ºC ∞		4ºC ∞		4ºC ∞	

4.6.3. Elektroforeza w żelu agarozowym

W celu sprawdzenia amplifikacji wybranego regionu DNA, produkty PCR rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym, sporządzonym w buforze 1xTBE z dodatkiem GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain [Biotum Inc., Fremont, Kalifornia, USA]. W kieszonki żelu nakładano 10 µl próby. Jako wzorzec ciężarów wysokocząsteczkowych stosowano Marker Gene Ruler 0,5 µg/µl [ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA], który nanoszono do pierwszej kieszonki w objętości 5 µl. Elektroforezę prowadzono w aparacie BioRad Power Pac 300 [BioRad, Hercules, Kalifornia, USA], w buforze elektrodowym (1xTBE) przy napięciu nie przekraczającym 3V/cm odległości między elektrodami. Wizualizacji fragmentów DNA dokonano z wykorzystaniem wizualizatora UV [Syngene, Wielka Brytania] emitującego światło nadfioletowe o długości 302 nm.

4.6.4. Oczyszczanie enzymatyczne produktów PCR

W celu oczyszczania produktów amplifikacji z pozostałych w roztworze, niewykorzystanych starterów i nie włączonych trifosforanów dezoksynukleozydów (dNTP), zastosowano egzonukleazę I [ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA] oraz alkaliczną fosfatazę [ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA]. Do 100 µl próbówek typu Eppendorf przeniesiono 3 µl produktu PCR, dodano 0,4 µl fosfatazy alkalicznej (1U/µl) oraz 0,1 µl egzonukleazy I (20U/µl) i uzupełniono wodą Millique do 10 µl. Próby zwirowano, a następnie inkubowano w termocyklerze BioRad C100 Thermal Cykler [BioRad, Hercules, Kalifornia, USA], według podanych w Tabeli nr 9 profili temperaturowych.

Tabela 9 Warunki reakcji enzymatycznego oczyszczania produktów PCR

37^{o}C	30 minut
85^{o}C	15 minut
4^{o}C	5 minut

Oczyszczone produkty reakcji PCR stanowiły matrycę do sekwencjonowania.

4.6.5. Sekwencjonowanie produktów amplifikacji

Sekwencjonowanie przeprowadzono metodą terminacji syntezy DNA w obecności trifosforanów di-deoksynukleotydów, tzw metodą Sangera [Sanger i in., 1977]. Do reakcji znakowania stosowano BigDye^{TM} Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit [Applied Biosystems^{TM}, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA] wykorzystując BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix oraz 5X Sequencing Buffer. Starterami, które zostały użyte do reakcji były odpowiednio te startery, przy pomocy których w reakcji PCR

uzyskano fragmenty DNA. w próbówkach typu Eppendorf o objętości 100 µl sporządzono mieszaninę reakcyjną, której skład przedstawiono w Tabeli nr 10.

Tabela 10 Składniki mieszaniny reakcyjnej do reakcji znakowania

Składnik	**Objętość na 1 próbę**
5X bufor do sekwencjonowania	2 µl
Mieszanina do znakowania BigDye™ Terminator v3.1	0,5 µl
Starter forward	0,5 µl
Woda Millique	4,5 µl
Matryca DNA	2,5 µl

Próby krótko wirowano przy 1200 rpm, a następnie inkubowano w termocyklerze BioRad C100 Thermal Cykler [BioRad, Hercules, Kalifornia, USA] według podanych w Tabeli nr 11 warunków reakcji.

Tabela 11 Warunki reakcji znakowania

Denaturacja wstępna	96ºC	2 minuty	
Denaturacja	96 ºC	30 sekund	25x
Przyłaczanie startera	50 ºC	15 sekund	
Synteza	60 ºC	4 minuty	
Chłodzenie	4 ºC	∞	

4.6.6. Oczyszczanie produktów sekwencjonowania

Otrzymane produkty oczyszczono z substratów nie włączonych podczas reakcji (enzymy, sole, nadmiar dideoksynukleotydów). w tym celu wykorzystano płytkę filtracyjną [Merck Life Science Sp.z.o.o., Darmstadt, Germany], gdzie do każdego dołka odważano 0,4 g Sephadex® G-50 [Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, United States of America], a następnie dodawano 300 µl wody Millique. Tak przygotowana płytkę inkubowano 2h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, w celu przemycia złoża, płytkę wirowano przez 8 min w temperaturze pokojowej przy 3180 rpm. Zmieniono płytkę odbierającą, a na złoże nałożono 10 µl produktu po znakowaniu. Płytkę zwirowano przy 3180 rpm w temperaturze pokojowej przez 3 min. Po wirowaniu, do każdego dołka dodano 15 µl wody Millique. Całość przeniesiono do próbówek, które zamknięto i zabezpieczono parafilmem.

Odczyt sekwencyjny wyznakowanych fragmentów DNA prowadzono w ramach usługi w firmie Genomed S.A. w Warszawie.

4.7. Hodowla izolatów grzybów w bi-kulturach na podłożach agarowych

W celu zbadania interakcji grzyb-grzyb wykonano testy *in vitro* w bikulturach, w systemie każdy izolat z każdym izolatem, na pożywce PDA. Do analizy wytypowano 13 izolatów grzybów (wymienione powyżej w Tabeli nr 2) wyizolowanych z endosfery roślin generacji G1 wzrastających w warunkach szklarniowych i zidentyfikowanych do poziomu gatunku na podstawie analiz molekularnych.

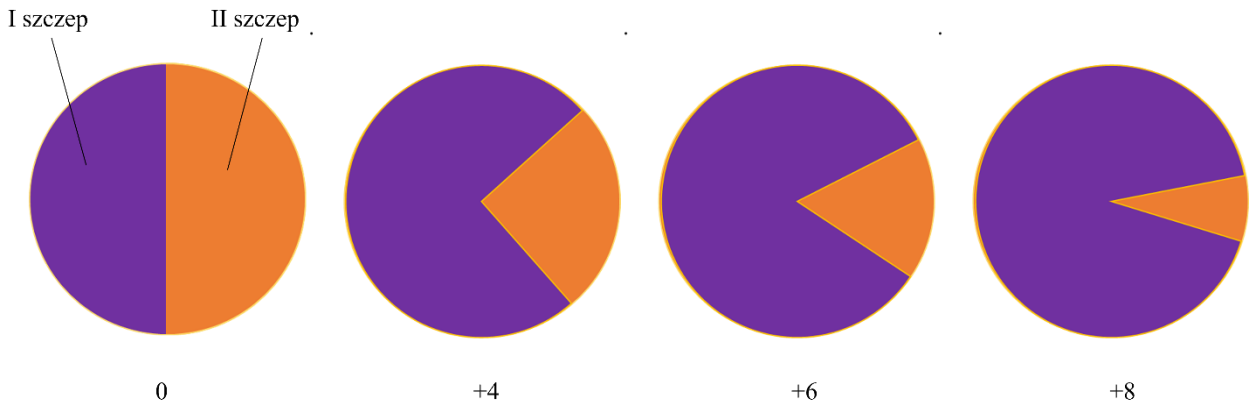
Izolaty grzybów pobrane z kolekcji ożywiano poprzez ich wzrost na płytkach Petriego o średnicy 90 mm z podłożem stałym PDA i inkubację w Sanyo MIR-254 [SanLab, Polska], w stałych warunkach świetlnych 12h/12h dzień/noc, w temperaturze 22^{o}C.

Dla każdej kombinacji grzyb-grzyb, krążki grzybni o średnicy 3mm, wycięte korkoborem z 7-dniowej kultury każdego szczepu, umieszczano w odległości 5 mm od brzegu szalki Petriego zawierającej 20 ml pożywki PDA. Odległość pomiędzy krążkami obu szczepów wynosiła 80 mm, jak pokazano na Rycinie 6.

Rycina 6 Schemat przedstawiający hodowlę grzybów w bikulturach.

Doświadczenie prowadzono w 3 powtórzeniach dla każdej kombinacji. Kontrolę stanowiły pojedyncze kultury badanych grzybów. Płytki inkubowano w 22°C, 12 godz./12 godz. ciemność/światło. Promieniowy wzrost każdego grzyba mierzono codziennie linijką do chwili kontaktu obu grzybni. Po 14 dniach inkubacji przeprowadzono jakościową ocenę oddziaływań grzybów w oparciu o zmodyfikowaną skalę Mańki [Mańka, 1974]: +8, jeden z izolatów grzybów (tzw. szczep główny) zajmuje 95% powierzchni płytki; +6, jeden z izolatów grzybów

zajmuje 85% powierzchni płytki; +4, jeden z izolatów grzybów zajmuje 75% powierzchni płytki, 0, jeden z grzybów zajmuje 50% powierzchni płytki [Popiel i in., 2008, Rycina 7].



Rycina 7 Schemat przedstawiający skalę wykorzystaną do jakościowej oceny oddziaływań grzybów

4.8. Analiza ekspresji genów metodą Real-time PCR

4.8.1. Izolacja RNA

Materiał do izolacji całkowitego RNA stanowiły fragmenty liści oraz korzeni aksenicznych siewek zebrane po 50 mg do 2 ml próbówek typu Eppendorf, przechowywane w temperaturze -80°C do czasu analiz (Rozdział 4.3.b.). Wszystkie czynności związane z rozdrobnieniem tkanek roślinnych wykonywano w ujemnych temperaturach. w tym celu moździerze i pistle były przechowywane co najmniej 24 h w temperaturze -20°C, a podczas procedury rozdrabniania umieszczano je w styropianowych pojemnikach z ciekłym azotem. Izolacje przeprowadzono zgodnie z protokołem zamieszczonym przez producenta The GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit [EurX Sp. z o.o., Gdańsk, Polska]. Wyizolowany RNA zawieszano w 40 µl wody.

4.8.2. Ocena ilościowa i jakościowa preparatów RNA

W celu sprawdzenia stężenia oraz czystości otrzymanego RNA przeprowadzono pomiary na spektrofotometrze NanoDrop [ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA]. Za dobrej jakości próbę uznawano, gdy współczynniki A260/A280 oraz A260/A230 wynosiły odpowiednio ~2 oraz 1,8-2,2. Przeprowadzono elektroforezę w 1% żelu agarozowym sporządzonym w buforze 1xTAE [Bioshop, Kanada] z dodatkiem GelRedTM Nucleic Acid Gel Strain [Biotum Inc., Fremont, Kalifornia, USA]. W kieszonki żelu nakładano 2 µl próby. Jako wzorzec ciężarów wysokocząsteczkowych Marker Gene Ruler 0,5 µg/µl [ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA], który nanoszono do pierwszej kieszonki w objętości 5 µl. Elektroforezę prowadzono w aparacie BioRad Power Pac 300 [BioRad,

Hercules, Kalifornia, USA], w buforze elektrodowym (1xTAE) przy napięciu nie przekraczającym 3V/cm odległości między elektrodami. Wizualizacji fragmentów DNA dokonano z wykorzystaniem wizualizatora UV [Syngene, Wielka Brytania] emitującego światło nadfioletowe o długości 302 nm.

4.8.3. Odwrotna transkrypcja

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono w termocyklerze BioRad C100 Thermal Cykler [BioRad, Hercules, Kalifornia, USA]. Wykorzystano komercyjny zestaw firmy BioRad - iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit [BioRad, Hercules, Kalifornia, USA), gdzie etapem poprzedzającym odwrotną transkrypcję było oczyszczenie prób z genomowego DNA. Reakcję przeprowadzono zgodnie z protokołem wskazanym przez producenta. Każdą z prób standaryzowano, by zawierała 1µg RNA.

4.8.4. Optymalizacja reakcji amplifikacji metodą PCR

W celu optymalizacji reakcji amplifikacji i oceny specyficzności wybranych na podstawie literatury starterów przeprowadzono konwencjonalny PCR. w Tabeli nr 12 przedstawiono sekwencje starterów, dla których optymalizowano warunki reakcji. Matrycę stanowiło cDNA uzyskane w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli nr 13, natomiast warunki reakcji w Tabeli nr 14. Wykonano gradient temperaturowy, gdzie temperatura zmieniała się o 1^{o}C.

Tabela 12 Startery dla potencjalnych genów referencyjnych oraz badanych genów markerów stresu.

Nazwa startera	Sekwencja startera 5'-3'	Nazwa genu	Referencje
GENY REFERENCYJNE			
140135-F	CCGGTATTGCCATGGATGC	TaYUC10.3 Gen zaangażowany w biosyntezę auksyn	Li i in., 2014
140135-R	AATTTTGCAGCATCTGATCGAA		
Ubiq-F	GCGAAGATCCAGGACAAGGA	Ubiq Ubikwityna	Jurczyk i in., 2014
Ubiq-R	CTGCTTACCGGCAAAGATGAG		
EF1A-F	CAGATCAGCAACGGCTATGC	EF1A Elongacyjny czynnik transkrypcyjny 1-α	
EF1A-R	TCTGGATCTCAGCAAACTTGACA		
ACT-F	ACCTTCAGTTGCCCAGCAAT	ACT Aktyna	
ACT-R	TCGACCGCTGGCATACAAG		
GAPDH-F	GGTGTCAATGAGAAGGAATACAAGTC	GAPDH Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	
GAPDH-R	CAAGAGGAGCAAGGCAGTTAGTG		
Tubb4-F	CATATGTTTCCGCACGTCAAAG	Tubb4 β-tubulina	
Tubb4-R	CTCATGGTAGCAGAGATAAGATGGTT		
ADP-F	GAGATGCGGATCCTGATGGT	ADP ADP-rybozylo transferaza	
ADP-R	CCCCGAGCTTGAGCTTGTAG		

CYP18-F	ACGGCTCCCAGTTCTTCATCT	CYP18 Cyklofilina A	
CYP18-R	CCCACCTTCTCGATGTTCTTG		
18S-R	GTGACGGGTGACGGAGAATT	18S Podjednostka rybosomu 18S	Scholtz i Visser, 2013
18S-F	GACACTAATGCGCCCGGTAT		
RLI-F	CGATTCAGAGCAGCGTATTGTTG	RLI RNAse L inhibitor like protein	
RLI-R	AGTTGGTCGGGTCTCTTCTAAAT		
Ta2291-F	GCTCTCCAACAACATTGCCAAC	ADP ADP-rybozylo transferaza	Paolacci, i in., 2009
Ta2291-R	GCTTCTGCCTGTCACATACGC		
Ta2776-F	CGATTCAGAGCAGCGTATTGTTG	RLI RNAse L inhibitor like protein	
Ta2776-R	AGTTGGTCGGGTCTCTTCTAAATG		
Ta54227-F	CAATACGCCATCAGGGAGAACATC	CDC Białka kontrolujące podziały komórkowe, nadrodzina ATPaz AAA	
Ta54227-R	CGCTGCCGAAACCACGAGAC		
Cyclophilin-F	CAAGCCGCTGCACTACAAGG	CYP18 Cyklofilina A	Crismani i in., 2006
Cyclophilin-R	AGGGGACGGTGCAGATGAA		
EFA1-cris-F	CAGATTGGCAACGGCTACG	EF1A Elongacyjny czynnik transkrypcyjny 1-α	
EFA1-cris-R	CGGACAGCAAAACGACCAAG		
GAPdH-F	TTCAACATCATTCCAAGCAGCA	GAPDH Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	
GAPdH-R	CGTAACCCAAAATGCCCTTG		
Actin-F	GACCCAGACAACTCGCACT	ACT Aktyna	
Actin-R	CTCGCATATGTGGCTCTTGA		
SAR-F	GAGTCTGCCCACCCATTCGTAA	SAR	Long i in., 2010
SAR-F	GACATGCCATAGGTTTCAGCGAC		
HnRNPQ-F	TCACCTTCGCCAAGCTCAGAACTA	HnRNPQ Heterogenna jądrowa rybonukleina Q	
HnRNPQ-R	AGTTGAACTTGCCCGAAACATGCC		
Actin-1-F	CTCTGACAATTTCCCGCTCA	ACT Aktyna	Zhang i in., 2016
Actin-1-R	ACACGCTTCCTCATGCTATCC		
B-actin-F	GTTCCAATCTATGATGAGGGATACACGC	β-actin Aktyna	Duan i in., 2014
B-actin-R	GAACCTCCACTGAGAACAACATTACC		
GAPDHa-F	ATTAAGGGTGGTGCCAAGCCG	GAPDH Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	Campos i in., 2018
GAPDHa-R	CAGACTTGTATTCCTTCTCATTGAC		
Actin-asbahiF	AATGGTCAAGGCTGGTTTCGC	Actin1 Aktyna	Al-Asbahi, 2012
Actin-asbahiR	CTGCGCCTCATCACCAACATA		
GENY MARKERÓW STRESU			
SOD-F	CATTGTCGATAGCCAGATTCCTTT	SOD Dysmutaza ponadtlenkowa	Zhang i in., 2016
SOD-R	AGTCTTCCACCAGCATTTCCAGTA		
POD-F	CAGCCCTGTAGCCAACATAAA	POD	

POD-R	GCACTTCCACGACTGCTTTG		
CAT-F	TTTGATGGGAGTCTTGTGCTTGTG	CAT katalaza	
CAT-R	ACGGTGAGGGAGTTGTCGTTGTT		
PR-1-F	CTGGAGCACGAACTCCAG	PR1	Duan i in., 2014
PR-1-R	CGAGTGCTGGAGCTTGCAGT		
PR2-F	CTCGACATCGGTAACGACCAG	PR2 B-1,3-glukanaza	
PR2-R	GCGGCGATGTACTTGATGTTC		
PR-3-F	AGAGATAAGCAAGGCCACGTC	PR3 endochitynaza	
PR-3-R	GGTTGCTCACCAGGTCCTTC		
PR-4-F	CGAGGATCGTGGACCAGTG	PR4 endochitynaza	
PR-4-R	GTCGACGAACTGGTAGTTGACG		
PR-5-F	ACAGCTACGCCAAGGACGAC	PR5 Białko podobne do taumatyny	
PR-5-R	CGCGTCCTAATCTAAGGGCAG		
PR-9-F	GAGATTCCACAGATGCAAACGAG	PR9 peroksydaza	
PR-9-R	GGAGGCCCTTGTTTCTGAATG		
PR-10-F	TTAAACCAGCACGAGAAACATCAG	PR10 Białko podobne do rybonukleazy	
PR-10-R	ATCCTCCCTCGATTATTCTCACG		
TA-JA2-F	AAGAAGGTGAGTGGGCTAT	TA-JA2	
TA-JA2-R	TGCGAAGGCTCTGTGAA		
Ta-GLP2a-F	AACAAAGGTGATGTGTTCGTCTT	Glp2a	
Ta-GLP2a-R	GAGCCGGTCTATTGTATTCTTTT		
pr-1-f	CAATAACCTCGGCGTCTTCATCAC	PR1	Casassola i in., 2015
pr-1-r	TTATTTACTCGCTCGGTCCCTCTG		
PR2-f	AAGCACTTTGGGCTGTTCAATCCG	PR2 B-1,3-glukanaza	
PR2-r	CCAGGCAGCTTATTCGAACGCAAA		
pr-4-f	AAGTGCCTCCAGGTGACGAA	PR4 endochitynaza	
pr-4-r	TGCACTGGTCGACGATCCT		
pr-9-f	CAAGGTGAACTCGTGATGGA	PR9 peroksydaza	
pr-9-r	TTGAGGATTCAACCGTCGTT		
pr-10-f	CAAGATGGTCGAGGCTTACC	PR10 Białko podobne do rybonukleazy	
pr-10-r	CGAAGTCGATCATGAAGCAA		
AMF-f	CAGGCTGGAGTGCAGAGAGGTAC	AMF	Al.-Asbahi 2012
AMF-r	ACAGACATGCACCACCACATC		
PR1.1f	CTGGAGCACGAAGCTGCAG	PR1	Desmond i in., 2005
PR1.1r	CGAGTGCTGGAGCTTGCAGT		
PAL-F	GGCCCACAAATCGAAGTTATTC	PAL	

PAL-R	GGAAGTTGCCACCGTGGAT		Sardesai i in., 2005
Ta-PERO-PR9-F	GAGATTCCACAGATGCAAACGAG	PR9 peroksydaza	Desmond i in., 2006
Ta-PERO-PR9-R	GGAGGCCCTTGTTTCTGAATG		
WCl2-F	TAGGAACTGGAACTTCACCGAGC	WCL2	
WCl2-R	GGTAGTCCTTGATGTGCAGCGAC		
HSP70-F	CGACTCGGAGCGTCTCATC	HSP70 Białko szoku cieplnego	Sardesai i in., 2005
HSP70-R	TGTCACTCTGACAGGGCATCA		
LIPASE-f	CACAAAATATCGACCCACCAC	LIPASE	Lu i in., 2006
LIPASE-r	ACTGGGTATTCGTCTGTCAGC		
PR5a-f	ACAGCTACGCCAAGGACGAC	PR5 Białko podobne do taumatyny	Gao i in., 2013
PR5a-r	CGCGTCCTAATCTAAGGGCAG		
CHI3f	GACCTCCTTGGCGTCAGCTA	CHI3 class 1b neutral chitinase	Liu i in., 2016
CHI3r	TGCATGTCTTCTCGCATCATATA		
TaAOS-f	TCCCGAGAGCGCTGTTTAAA	TaAOS JA biosynthesis	
TaAOS-r	GACGATTGACGGCTGCTATGA		
GNS-f	TCATCCTCGACATCGGTAACG	GNS	Sardesai i in., 2005
GNS-r	CGGCGATGTACTTGATGTTCA		
Chitinase1-PR3-f	AGAGATAAGCAAGGCCACGTC	PR3 endochitynaza	Wang i in., 2016
Chitinase1-PR3-r	GGTTGCTCACCAGGTCCTTC		
Wheatwin1-2-PR4-f	CGAGGATCGTGGACCAGTG	PR4 endochitynaza	
Wheatwin1-2-PR4-r	GTCGACGAACTGGTAGTTGACG		
WAS3a-PR5-f	ACAGCTACGCCAAGGACGAC	PR5 Białko podobne do taumatyny	Ameya i in.
WAS3a-PR5-r	CGCGTCCTAATCTAAGGGCAG		
WCI-5-f	CATCTGGACCACCTTCAACCA	PR17	Sardesai i in., 2005
WCI-5-r	ACTGGGCTCGGAGTTGGATA		
LRK10-f	CCGTCCTGCTGCTACCTCTT	LRK	
LRK10-r	TACCGCCACATCCACATGAT		
Cyclops-f	ATCTAGGTTGTCATCAGAGGCAG	CYCLOPS	Campos i in., 2018
Cyklops-r	GTTATTCGTGTATTCAGGAGGAA		
CCaMK-f	GATTATGGATTTCGGTTTGAGTT	CAMK	
CCaMK-r	ATGAAATGGTGGGCATCCG		
POLLUX-f	ACCTGGCTTGGCACAGATATG	POLLUX	
POLLUX-r	GGCACAGCATCAGGGAATG		
CASTOR-f	CATGATGCTTGGTCTTGTGACTG	CASTOR	
CASTOR-r	TTCAGTAAAGATCCCAACTTGTC		

SCL26-f	AACTGCATACTCCACCAAGC	SCL	
SCL26-r	CCTCCTCCTCGTTCTTCTCC		

Tabela 13 Skład mieszaniny reakcyjnej

Składnik	Stężenie wyjściowe	Objętość na 1 próbę
Bufor reakcyjny PCR 10x stężony (DreamTaq Green Buffer, Thermo Scientific)	10X	2,5 µl
Starter F	100µM	0,2 µl
Starter R	100µM	0,2 µl
Mieszanina dNTP (Sigma Aldrich)	2,5µM	1,5 µl
Matryca cDNA	50ng/µl	1 µl
Polimeraza (Dream Taq, Thermo Scientific	2U/µl	0,25 µl
Woda		19,35 µl

Tabela 14 Warunki reakcji PCR

Proces	Powtórzenie	Temperatura	Czas
Denaturacja wstępna	1x	94°C	2 minuty
Denaturacja	40x	94 °C	5 sekund
Przyłączanie starterów		Zmiennie*	30 sekund
Synteza		72 °C	1 minuta
Synteza końcowa	1x	72 °C	3 minuty
przechowywanie	1x	4 °C	∞

*gradient temperaturowy w zakresie temperatur 55°C-62°C

W celu sprawdzenia poprawności wykonania reakcji PCR oraz wybrania najlepszej temperatury wiązania badanych starterów wykonano elektroforezę w 1,5% żelu agarozowym w buforze 1xTBE z dodatkiem GelRedTM Nucleic AcidGel Strain [Biotum Inc., Fremont, Kalifornia, USA]. W kieszonki żelu nakładano 5 µl próby. Jako wzorzec ciężarów wysokocząsteczkowych wykorzystano Marker Gene Ruler 0,5 µg/µl [ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA], który nanoszono do pierwszej kieszonki w objętości 5 µl. Elektroforezę prowadzono w aparacie BioRad Power Pac 300 [BioRad, Hercules, Kalifornia, USA], w buforze elektrodowym (1xTBE) przy napięciu nie przekraczającym 3V/cm odległości

między elektrodami przez 40 minut. Wizualizacji fragmentów DNA dokonano z wykorzystaniem wizualizatora UV [Syngene, Wielka Brytania] emitującego światło nadfioletowe o długości 302 nm.

4.8.5. Reakcja Real-time qPCR

Reakcję Real-time qPCR przeprowadzano w objętości 10 µl z wykorzystaniem aparatu CFX-96 Real-Time System [BioRad, Herkules, Kalifornia, USA] oraz komercyjnie dostępnego zestawu tej samej firmy: iTaq Universal SYBR Green Supermix [BioRad, Hercules, Kalifornia, USA]. Matrycą do tej reakcji było uzyskane w reakcji odwrotnej transkrypcji cDNA. Skład mieszaniny reakcyjnej pokazano w Tabeli nr 15, natomiast profil temperaturowy w Tabeli nr 16.

Tabela 15 Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji real-time qPCR

Składnik	Stężenie wyjściowe	Objętość dla 1 próby
iTaq SYBR Green		5 µl
Starter F	100mM	0,75 µl
Starter R	100mM	0,75 µl
Matryca cDNA		3,5 µl

Tabela 16 Profil temperaturowy zastosowany w reakcji real-time qPCR

Proces			Temperatura	czas	Powtórzenia
Amplifikacja w czasie rzeczywistym	Denaturacja wstępna		98 °C	2 min	1x
	Denaturacja		98 °C	0,15 s	40x
	Przyłączanie starterów		zmiennie	1 min	
	Synteza	Pojedynczy odczyt fluorescencji	72 °C	30 s	
Krzywa topnienia produktów PCR	Przyłączanie starterów	Ciągły odczyt fluorescencji	65 °C	0,05 s	1x
	Denaturacja		95 °C	0,5 s	1x
	Chłodzenie		4 °C	10 min	1x

4.8.6. Analiza stabilności genów

Gen uznawano za stabilny, jeśli jego ekspresja była równoważna we wszystkich badanych próbkach. Stabilność genów badano trzema różnymi algorytmami: geNorm [Vandesompele i in., 2002], NormFinder [Andersen i in., 2004] i BestKeeper [Pfaffl i in., 2004] oraz z porównawczej metody delta-Ct [Silver i in., 2006]. Analizy z geNorm (wersja 3.5), NormFinder (wersja 0.953) oraz porównawczej metody delta-Ct przeprowadzono na ΔCq, a analizę z BestKeeper (wersja 1.0) na surowych danych Cq jako danych wyjściowych. Każde traktowanie badano niezależnie oraz zbiorczo.

Do analizy otrzymanych wyników wykorzystano program CFX Maestro [BioRad, Hercules, Kalifornia, USA]. Do analizy zmiany ekspresji badanych genów względem genów referencyjnych wykorzystano metodę $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [Schmittgen i Livak, 2008].

4.9. Analiza danych i wizualizacja wyników

4.9.1. Analiza chromatogramów

Za pomocą programu Chromas v.2.6.6 [Applied Biosystems] dokonano analizy uzyskanych sekwencji DNA.

4.9.2. Analiza porównawcza sekwencji

Analizę porównawczą przeprowadzono z zastosowaniem algorytmu CLUSTAL w [Thompson i in., 1994] oraz BLAST [Altschul i in., 1990]. Analizę porównawczą sekwencji regionu ITS1, ITS2 rDNA, dużej podjednostki (LSU) nrRNA [Vilgalys i Hester, 1990] oraz małej podjednostki (SSU) nrRNA [White i in., 1990], fragmentu genu elongacyjnego czynnika translacyjnego 1-α (*tef1*) [Roger i in., 1999], fragmentu genu β-tubuliny (*tub2*) [Edlind i in., 1996], fragmentu genu aktyny (*act*) [Drouin i in., 1995] oraz fragmentu genu kalmoduliny (*cmd*) wykonano przy pomocy programu Geneious v. 2022.2.1 [Kearse i in., 2012]. Dane sekwencyjne do analizy porównawczej zostały przygotowane poprzez ręczne dopasowanie wielu sekwencji (ang. *multiple sequence aligments*), uzyskanych z użyciem narzędzia CLUSTALW [Thompson i in. 1994]. Poprawek dokonano przy użyciu programu BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.2.6 (31.3.2017) [Hall, 1999].

4.9.3. Analiza bioróżnorodności

Skład i zróżnicowanie mykobiomu nadziemnych i podziemnych części pszenicy (korzenie, liście, łodygi i nasiona) oraz dziesięciu odmian pszenicy w dwóch analizowanych pokoleniach, dwóch systemach uprawy (ekologiczna i tradycyjna) oraz dwóch warunkach uprawy (pole oraz szklarnia) generacji G1 oceniano za pomocą wskaźnika bioróżnorodności

Shannona (H), wskaźnika równości Shannona (E) [Shannon, 1948], wskaźnika Margalef'a (MRI) [Margalef, 1951] oraz wskaźnika Menhinick'a (d) [Menhinick, 1964].

Zastosowano następujące równania:

$$H = -\sum_{i=1}^{S} pi * \ln(pi)$$

$$pi = \frac{ni}{Ni}$$

$$E = \frac{H}{\ln(S)}$$

$$MRI = \frac{S-1}{\ln Ni}$$

$$d = \frac{S}{\sqrt{\sum_i ni}}$$

Gdzie:

H – wskaźnik różnorodności Shannona (ang. *Shannon Index*),

E_H – wskaźnik równości (ang. *Equitability Index*),

MRI – wskaźnik Margalefa (ang. *Margalef Richness Index*),

d – wskaźnik Menhinick'a (ang. *Menhinick Index*),

ni - liczebność osobników danego gatunku,

Ni - liczebność wszystkich osobników wszystkich gatunków.

S – liczba osobników na danym obszarze (w odmianie/części rośliny)

4.9.4. Analiza wpływu szczepu II na wzrost szczepu i w testach biologicznych w bikulturach na podłożu PDA

Analizę wpływu wzrostu badanych grzybów względem siebie wykonano dla pomiarów dokonanych w 5 dniu po ko-inkubacji na podłożu PDA. Procent inhibicji wzrostu obliczono według poniższego wzoru [Edington i in., 1971]:

$$I = \frac{Rc - R}{Rc} \times 100$$

Gdzie:

I – współczynnik wzrostu

Rc – średnia wzrostu szczepu głównego w kontroli

R – średnia wzrostu szczepu głównego w bikulturze

Jakościową ocenę wzrostu grzyba (szczep I) oparto na obserwacjach kolonii po 14 dniach wzrostu w bikulturze. w celu selekcji najbardziej i najmniej skutecznych antagonistów wartości [zmodyfikowana skala Mańki, 1974; Popiel i in. 2008] zostały uśrednione i porównane.

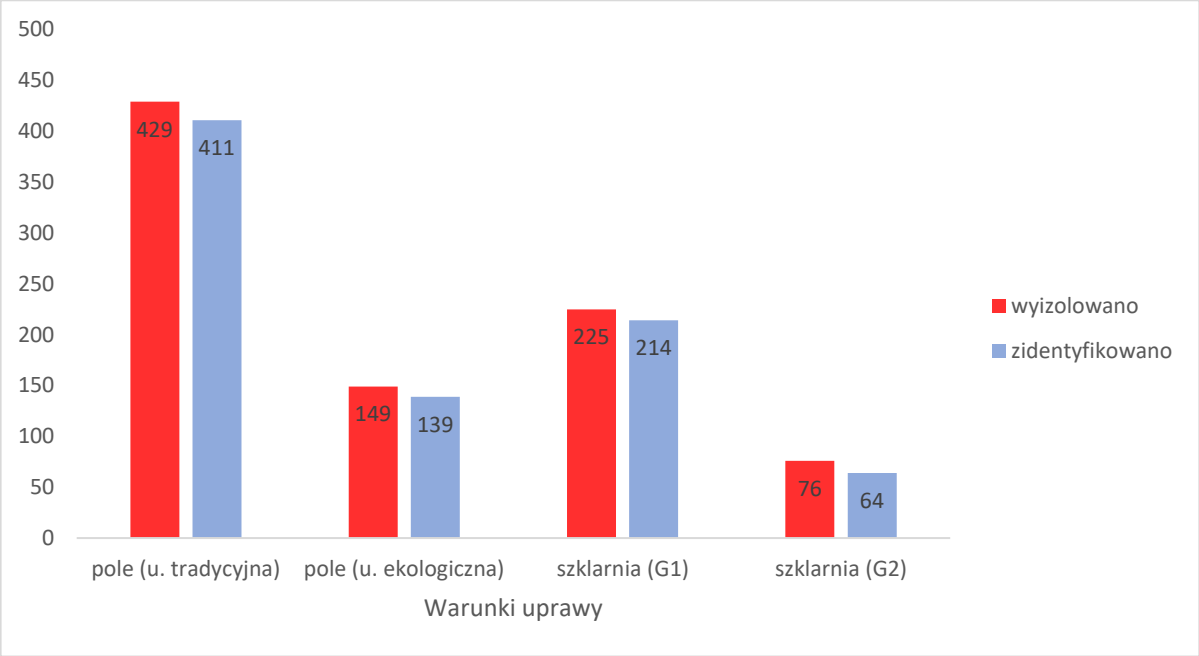
W celu zobrazowania kinetyki wzrostu szczepów w bi-kulturach przeprowadzono analizę krzywych regresji wzrostu. Regresję liniową obliczono dla każdego szczepu i w obecności lub nie (kontrola) szczepu II (w trzech powtórzeniach) w oparciu o pomiary wykonywane w dniach od 1 do 5 po ko-inkubacji. Analizę wariancji wzrostu kolonii szczepu i przeprowadzono dla wszystkich interakcji szczep I-szczep II we wszystkich dniach obserwacji na poziomie istotności α=0,001.

4.9.5. Wizualizacja danych i analiza statystyczna

Diagramy Venn,a, jak i siecio-podobne diagramy Venn'a (ang. *network-like Venn diagram*) zostały uzyskane dzięki wykorzystaniu programu Cytoscape (v. 3.8.2) [Shannon i inni, 2003]. Wykresy sporządzono z wykorzystaniem pakietu ggplot2 [Wickham, 2016] w środowisku R [R.C. Team., 2021] lub w programie Exel. Analizę statystyczną wyników przeprowadzono z wykorzystaniem środowiska R.

V. WYNIKI

W wyniku prowadzonych doświadczeń w pracy doktorskiej wyizolowano z endosfery polskich odmian pszenicy zwyczajnej 879 izolaty grzybów, z czego molekularnie zidentyfikowano 828 na poziomie gatunku zidentyfikowano 521. Na Rycinie 8 przedstawiono liczby izolatów z uwzględnieniem generacji i warunków wzrostu roślin i wyników identyfikacji molekularnej. Lista zidentyfikowanych molekularnie izolatów została umieszczona w suplemencie wraz z numerami akcesyjnymi dla sekwencji zdeponowanych w GenBank NCBI [Sayers i in., 2021] (Tabela S1) oraz sekwencjami w formacie FASTA.



Rycina 8 Liczba szczepów grzybów endofitycznych wyizolowana (kolor czerwony) oraz zidentyfikowana (kolor niebieski) u roślin wzrastających w warunkach szklarniowych (generacja G1) i polowych – uprawa ekologiczna oraz tradycyjna.

5.1. Doświadczenie nr 1

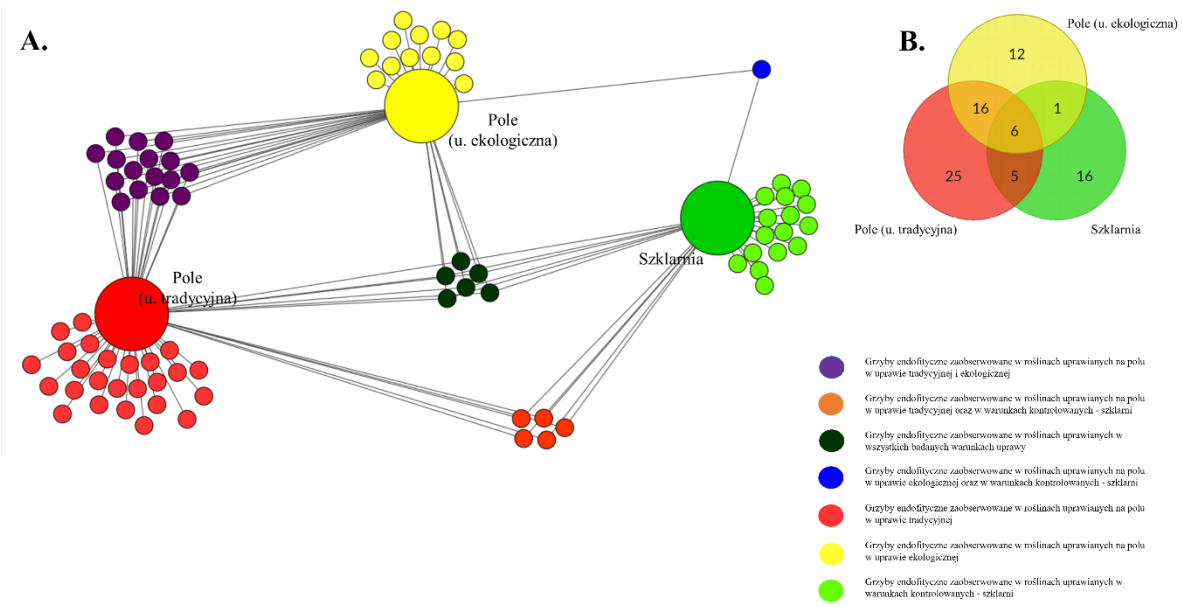
Doświadczenie nr 1 polegało na wyizolowaniu i zidentyfikowaniu grzybów endofitycznych z części nadziemnych i podziemnych dziesięciu odmian pszenicy rosnącej w warunkach szklarniowych (generacja G1) oraz w warunkach polowych (uprawa ekologiczna oraz tradycyjna).

5.1.1. Kształtowanie się struktury społeczności grzybów endofitycznych wyizolowanych z endosfery roślin pszenicy zdeterminowany jej warunkami uprawy.

W generacji G1, w poszczególnych systemach uprawy (warunki szklarniowe, warunki polowe – uprawa ekologiczna i tradycyjna) wyizolowano 803 szczepy grzybów, z czego molekularnie zidentyfikowano 764 szczepy. Na ryc. 8 przedstawiono ilość wyizolowanych (kolor czerwony) oraz zidentyfikowanych (kolor niebieski) szczepów grzybów endofitycznych.

Przeprowadzono reakcję sekwencjonowania fragmentów DNA uzyskanych w reakcji amplifikacji regionu ITS1-ITS2 rDNA dla 803 szczepów. Analiza porównawcza uzyskanych sekwencji z sekwencjami zamieszczonymi w bazie danych NCBI z wykorzystaniem programu BLAST pozwoliła na jednoznaczne (podobieństwo sekwencji wynosiło >99% na całej długości analizowanego fragmentu DNA) określenie rodzaju dla wszystkich badanych izolatów. W kolejnym etapie przeprowadzono reakcję sekwencjonowania fragmentów DNA uzyskanych w reakcji amplifikacji fragmentu genu *tef1* dla 144 szczepów, fragmentu genu *β-tub* dla 209 szczepów, fragmentu genu *act* dla 19 szczepów, a także uzyskanych w reakcji amplifikacji dużej podjednostki nrDNA dla 75 szczepów oraz małej podjednostki nrDNA dla 113 szczepów. Na podstawie przeprowadzonych analiz zidentyfikowano 764 szczepy grzybów endofitycznych wyizolowanych z roślin uprawianych w warunkach kontrolowanych (szklarnia) oraz polowych (uprawa ekologiczna i tradycyjna).

Zidentyfikowano 28 gatunków lub rodzajów endofitów, otrzymanych z roślin uprawianych w warunkach szklarniowych, z roślin uprawianych w systemie ekologicznym na polu 35 gatunków lub rodzajów, a z pszenicy uprawianej w systemie tradycyjnym 52 gatunki lub rodzaje.



Rycina 9 a - sieć powiązań wspólnych rodzajów/gatunków grzybów endofitycznych występujących w analizowanych systemach uprawy pszenicy; **B** – diagram Venna obrazujący unikalny i wspólny mykobiom endosfery roślin pszenicy dla trzech systemów uprawy.

Rycina 9A przedstawia sieć wzajemnych powiązań rodzajów bądź gatunków grzybów występujących w roślinach uprawianych w trzech systemach uprawy (warunki kontrolowane – szklarnia, warunki polowe – uprawa tradycyjna i ekologiczna). Na diagramie Venn'a (Ryc. 9B)

przedstawiono liczbowe odzwierciedlenie prezentowanej sieci. Analizując przedstawione powyżej wyniki zaobserwowano, że *Penicillium chrysogenum* oraz grzyby z rodzaju *Sarocladium sp., Penicillium sp., Alternaria sp., Cladosporium sp.* i *Fusarium sp.* występują w roślinach wzrastających w szklarni i na polu w obu strategiach uprawy (ekologicznej i tradycyjnej). *Penicillium olsonii* zidentyfikowano w pszenicy uprawianej w warunkach kontrolowanych oraz na polu – uprawa ekologiczna. Natomiast grzyby z rodzaju *Periconia sp., Talaromyces sp., Anthracocystis sp., Moesziomyces sp.*, a także gatunki *Microdochium bolleyi, Phoma pomorum, Fusarium avenaceum, Exserophilum pedicellatum, Aureobasidium pullulans, Anthracocystis flocculosa, Fusarium oxysporum, Waitea circinata, Fusarium solani, Alternaria alternata, Periconia macrospinosa* i *Setophoma terrestris* zaobserwowano w roślinach uprawianych na polu w obu strategiach uprawy: ekologicznej i tradycyjnej. Pięć gatunków lub rodzajów grzybów endofitycznych: *Fusarium proliferatum, Sarocladium strictum, Penicillium crustosum, Nigrospora gorlenkoana* oraz *Trichoderma sp.*, zidentyfikowano w roślinach rosnących zarówno w szklarni jak i na polu w uprawie tradycyjnej. Natomiast grzyby z rodzaju *Meyerozyma sp., Colletotrichum sp., Didymella sp., Gibellulopsis sp., Meira sp., Penidiella sp., Verticillium sp*. oraz gatunki *Alternaria alternata, Epicoccum nigrum, Fusarium temperatum, Leptobacillium leptobactrum, Moesziomyces bullatus, Setophoma terrestis* wyizolowano z roślin w ekologicznym systemie uprawy. w warunkach szklarniowych zaobserwowano grzyby z rodzaju *Phlebia sp., Aspergillus sp., Acremonium sp.* oraz gatunki takie jak *Trichoderma viride, Trichoderma koningii, Trichoderma hamatum, Sarocladium spinificis, Pseudogymnoascus pannorum, Penicillium expansum, Penicillium digitatum, Parengyodontium album, Clonostachys candelabrum, Cladosporium cladosporoides, Chrysosporium pseudomerdarium, Akanthomyces lekanii, , Acremonium sclerotigenum.*

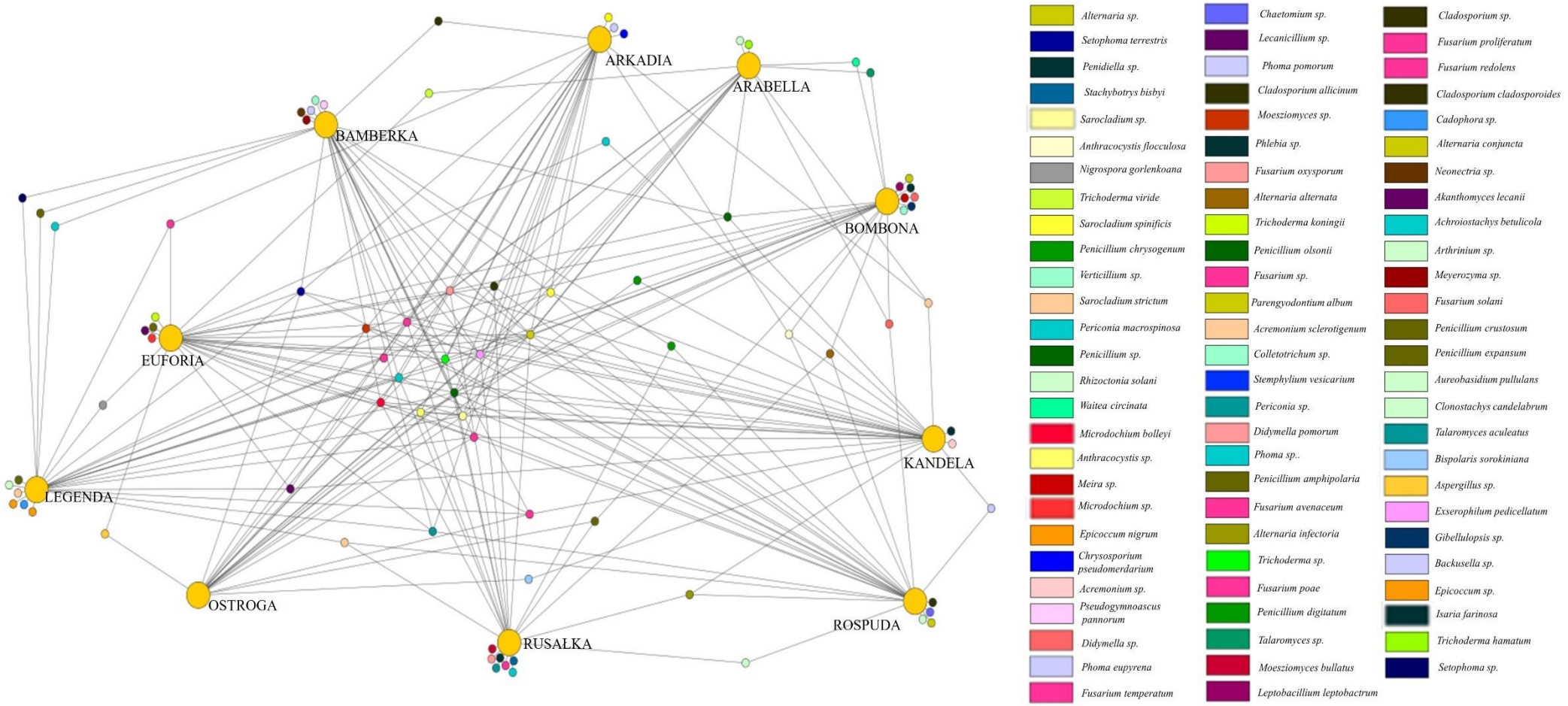
Najliczebniejszą grupę endofitów wyizolowano z pszenicy uprawianej tradycyjnie na polu. Były to grzyby z rodzaju *Backusella sp., Chaetomium sp., Lecanicillium sp., Epicoccum sp., Arthrinium sp., Phoma sp., Cadophora sp., Neonectria sp., Microdochium sp., Setophoma sp.*, oraz gatunki grzybów takie jak: *Isaria farinosa, Penicillium amphipolaria, Alternaria conjuncta, Alternaria infactoria, Stemphylium vesicarium, Fusarium redolens, Fusarium poae, Rhizoctonia solani, Phoma eupyrena, Didymella pomorum, Stachybotrys bisbyi, Cladosporium allicinum, Bipolaris sorokiniana, Achroiostachys betulicola, Talaromyces aculeatus*.

5.1.2 Kształtowanie się struktury społeczności grzybów endofitycznych wyizolowanych z endosfery roślin pszenicy, zdeterminowane odmianą pszenicy.

Rycina nr 10 (oraz Tabela nr S2) przedstawia sieć wzajemnych powiązań rodzajów bądź gatunków grzybów występujących w dziesięciu badanych odmianach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) niezależnie od systemu uprawy.

W pszenicy jarej odmiany Arabella występują grzyby z rodzaju *Alternaria, Cladosporium, Fusarium, Penicillium, Talaromyces, Sarocladium* oraz *F. oxysporum, W. circinata, E. pedicellatum, F. solani, A. sclerotigenum, C. candelabrum, P. olsonii, S. spinificis, T. viride, T. hamatum*. z pszenicy ozimej odmiany Arkadia wyizolowano grzyby z rodzaju *Penicillium, Anthracocystis, Moesziomyces, Alternaria, Fusarium, Periconia, Trichoderma, Sarocladium* oraz *S. vesicarium, E. pedicellatum, F. avenaceum, F. poae, F. proliferatum, M. bolleyi, P. macrospinosa, P. eupyrena, S. terrestris, A. flocculosa, A. sclerotigenum, C. cladosporioides, S. spinificis, A. lecanii, C. pseudomerdarium*. z pszenicy ozimej odmiany Bamberka wyizolowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Backusella, Colletotrichum Fusarium, Meyerozyma, Neonectria, Penicillium, Periconia, Phoma, Sarocladium, Setophoma* oraz *E. pedicellatum, F. oxysporum, F. redolens, M. bolleyi, P. macrospinosa, S. terrestris, P. chrysogenum, F. proliferatum, P. pannorum, P. olsonii, S. spinificis, P. crustosum, C. cladosporioides*. w pszenicy jarej odmiany Bombona występują grzyby z rodzaju *Alternaria, Anthracocystis, Didymella, Fusarium, Gibellulopsis, Meira, Penicillium, Penidiella, Talaromyces, Trichoderma, Sarocladium, Verticillium* oraz A. *alternata, A. flocculosa, E. pedicellatum, F. solani, F. oxysporum, L. leptobactrum, P. crustosum, P. digitatum, P. olsonii, P. album, W. circinata*. z pszenicy ozimej odmiany Euforia wyizolowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Fusarium, Lecanicillium, Microdochium, Penicillium, Periconia, Phoma, Sarocladium, Trichoderma* oraz A. *lecanii, E. pedicellatum, F. oxysporum, F. avenaceum, F. redolens, F. poae, F. proliferatum M. bolleyi, N. gorlenkoana, P. macrospinosa, P. expansum, P. olsonii, S. terrestris, T. koningii, T. viride*. w pszenicy jarej odmiany Kandela występują grzyby z rodzaju *Acremonium, Alternaria, Anthracocystis, Fusarium, Moesziomyces, Penicillium, Phlebia, Phoma, Sarocladium* oraz A. *infectoria, A. flocculosa, A. sclerotigenum, A. lecanii, B. sorokiniana, E. pedicellatum, F. oxysporum, F. proliferatum, F. redolens, M. bolleyi, P. macrospinosa, P. pomorum, P. olsonii, P. digitatum, S. spinificis, S. terrestris*. z pszenicy ozimej odmiany Legenda wyizolowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Cadophora, Epicoccum, Fusarium, Penicillium, Periconia, Phoma, Sarocladium, Setophoma* oraz A. *sclerotigenum, A. lecanii, E. pedicellatum, E. nigrum, F. avenaceum, F. oxysporum, F. poae, F. proliferatum, F. redolens, M. bolleyi, N.*

gorlenkoana, P. crustosum, P. amphipolaria, P. macrospinosa, R. solani, S. spinificis, S. strictum, S. terrestris. z pszenicy ozimej odmiany Ostroga wyizolowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Anthracocystis, Aspergillus, Cladosporium, Fusarium Moesziomyces, Penicillium, Sarocladium* oraz *B. sorokiniana, E. pedicellatum, F. redolens, F. oxysporum, F. proliferatum, M. bolleyi, P. macrospinosa, P. crustosum, P. digitatum, S. spinificis, S. terrestris*. w pszenicy jarej odmiany Rospuda występują grzyby z rodzaju *Alternaria, Anthracocystis, Arthrinium, Chaetomium, Cladosporium, Fusarium, Moesziomyces, Penicillium Periconia*, oraz A. *flocculosa, A. pullulans, A. alternata, A. conjuncta, A.infectoria, C. allicinum, E. pedicellatum, F. oxysporum, F. solani, M. bolleyi, P. chrysogenum, P. pomorum, P. macrospinosa, S. spinificis, S. strictum, S. terrestris*. w pszenicy jarej odmiany Rusałka występują grzyby z rodzaju *Alternaria, Anthracocystis Cladosporium, Fusarium, Penicillium, Trichoderma* oraz A. *alternata, A. infectoria, A. pullulans, A. betulicola, D. pomorum, E. pedicellatum, F. oxysporum, F. temperatum, I. farinosa, M. bolleyi, M. bullatus, P. macrospinosa, P. chrysogenum, P. crustosum, S. bisbyi, S. strictum, T. aculeatus*.



Rycina 10 Sieć powiązań wspólnych rodzajów/gatunków grzybów endofitycznych występujących w badanych odmianach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)

Analizowano też społeczność grzybów pod kątem ich występowania w badanych odmianach pszenicy w poszczególnych systemach uprawy (Ryciny nr 11-13; Tabela nr S3).

Społeczność grzybów występująca w tkankach pszenicy wzrastających w warunkach kontrolowanych (szklarnia) jest najbardziej uboga wśród badanych systemów uprawy, co przedstawia Rycina nr 11. z pszenicy odmiany jarej Arabella wyizolowano grzyby z rodzaju *Penicillium* oraz A. *sclerotigenum, C. candelabrum, P. olsonii, S. spinificis, T. hamatum, T.viride*. z roślin pszenicy odmiany Arkadia wyizolowano grzyby z rodzaju *Penicillium* i *Sarocladium* oraz A. *sclerotigenum, A. lekanii, C. cladosporoides, C. pseudomerdarium, F. proliferatum, S. spinificis*. w pszenicy odmiany Bamberka występują grzyby z rodzaju *Sarocladium* i *Penicillium* oraz *C. cladosporoides, F. proliferatum, P. pannorum, P. olsonii, P. crustosum, S. spinificis*. w pszenicy odmiany Bombona występują grzyby z rodzaju *Penicillium* i *Trichoderma* oraz P. *digitatum, P. olsonii, P. album*. w pszenicy odmiany Euforia występują grzyby z rodzaju *Aspergillus, Alternaria, Fusarium, Penicillium, Sarocladium, Trichoderma* oraz A. *lecanii, F. proliferatum, N. gorlenkoana, P. expansum, P. olsonii, T. viride, T. koningii*. z pszenicy odmiany Kandela wyizolowano grzyby z rodzaju *Acremonium, Penicillium, Phlebia, Sarocladium* oraz A. *sclerotigenum, A. lecanii, P. digitatum, P. olsonii, S. spinificis*. z pszenicy odmiany Legenda wyizolowano grzyby z rodzaju *Penicillium* i *Sarocladium* oraz A. *sclerotigenum, A. lecanii, F. proliferatum, P. crustosum, S. spinificis*. w pszenicy odmiany Ostroga występują grzyby z rodzaju *Aspergillus, Fusarium, Penicillium, Sarocladium* oraz *F. proliferatum, P. crustosum, P. digitatum, S. spinificis*. w pszenicy odmiany Rospuda występują grzyby z rodzaju *Fusarium* i *Penicillium* oraz P. *chrysogenum* i *S. spinificis*. w pszenicy odmiany Rusałka występują grzyby z rodzaju *Cladosporium* i *Penicillium* oraz P. *chrysogenum* i *S. strictum*

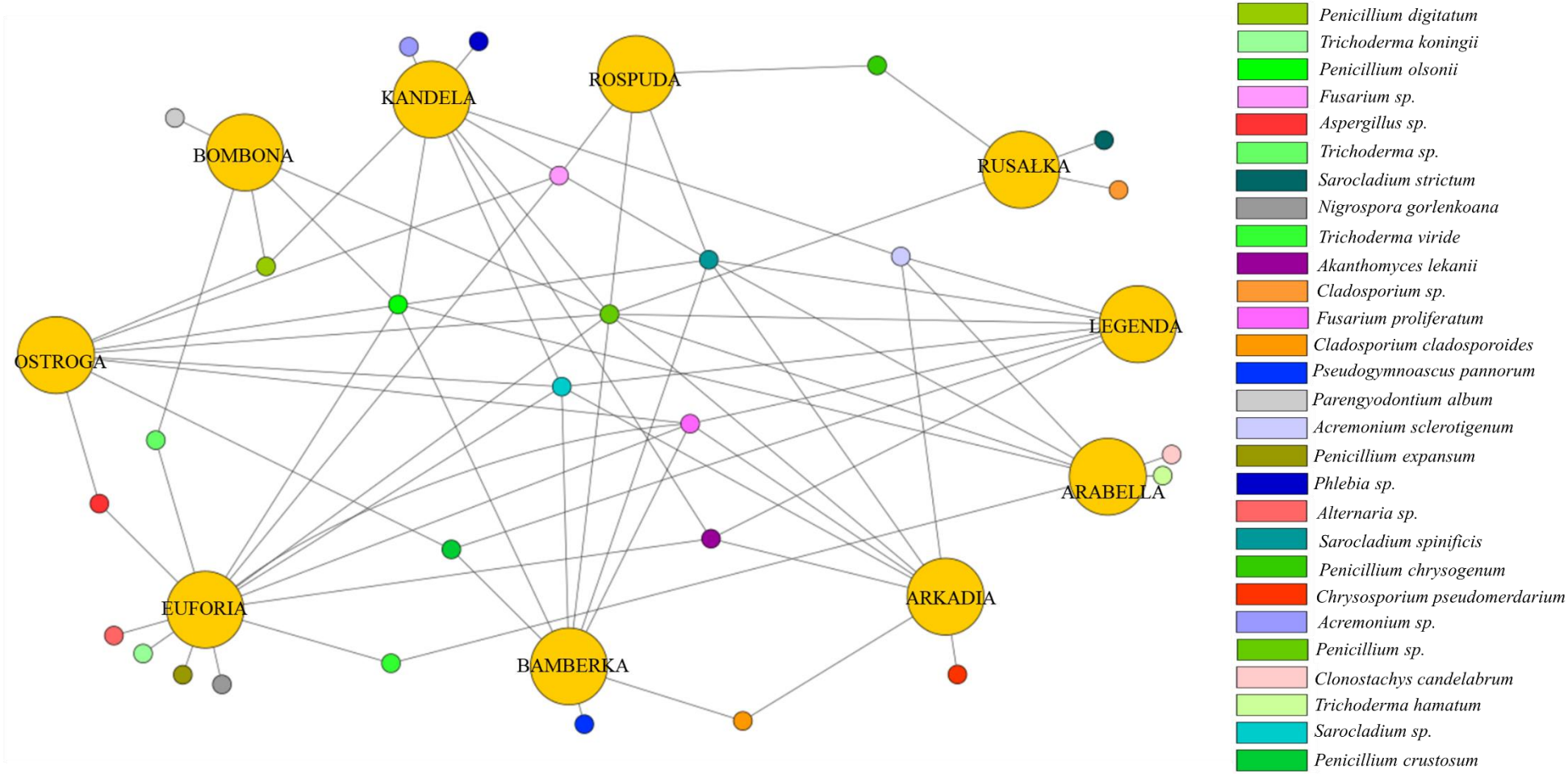
W warunkach polowych, w uprawie ekologicznej (Rycina nr 12) w odmianie jarej Arabella zidentyfikowano szczepy *F. proliferatum, F. solani* oraz grzyby z rodzaju *Cladosporium, Fusarium, Penicillium, Sarocladium* i *Talaromyces*. z pszenicy odmiany ozimej Arkadia wyizolowano tylko szczep P. *olsonii*. w pszenicy odmiany ozimej Bamberka występują grzyby z rodzaju *Alternaria, Colletotrichum, Fusarium, Meyerozyma, Periconia* oraz *F. oxysporum, M. bolleyi*, P. *macrospinosa*, P. *chrysogenum, S. terrestris*. w odmianie jarej Bombona zidentyfikowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Anthracocystis, Didymella, Fusarium Gibelulopsis, Meira, Penicillium, Penidiella, Sarocladium, Talaromyces, Verticillium* oraz A. *flocculosa, E. pedicellatum, F. oxysporum, L.leptobactrum, P. olsonii, Waitea circinata*. z pszenicy ozimej odmiany Euforia wyizolowano grzyby z rodzaju

Alternaria i *Periconia* oraz P. *macrospinosa*. w pszenicy odmiany Kandela zidentyfikowano grzyby z rodzaju *Fusarium, Moesziomyces, Penicillium, Sarocladium* oraz A. *flocullosa, M. bolleyi, S. terrestris*. z pszenicy odmiany Legenda wyizolowano grzyby *E. nigrum, F. avenaceum, M. bolleyi*, natomiast z roślin odmiany Ostroga wyizolowano grzyby z rodzaju *Anthracocystis, Cladosporium* i *Moesziomyces* oraz *E. pedicellatum, M. bolleyi* i *S. terrestris*. w pszenicy odmiany Rospuda zidentyfikowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Anthracocystis, Penicillium* oraz A. *alternata, A. pullulans, E. podicellatum, F. oxysporum, M. bolleyi, P. chrysogenum, P. pomorum, S. terrestris*. z pszenicy odmiany Rusałka wyizolowano grzyby z rodzaju *Anthracocystis, Cladosporium* oraz *Fusarium* i *F. oxysporum, F. temperatum, M. bolleyi, M. bullatus, P. macrospinosa*.

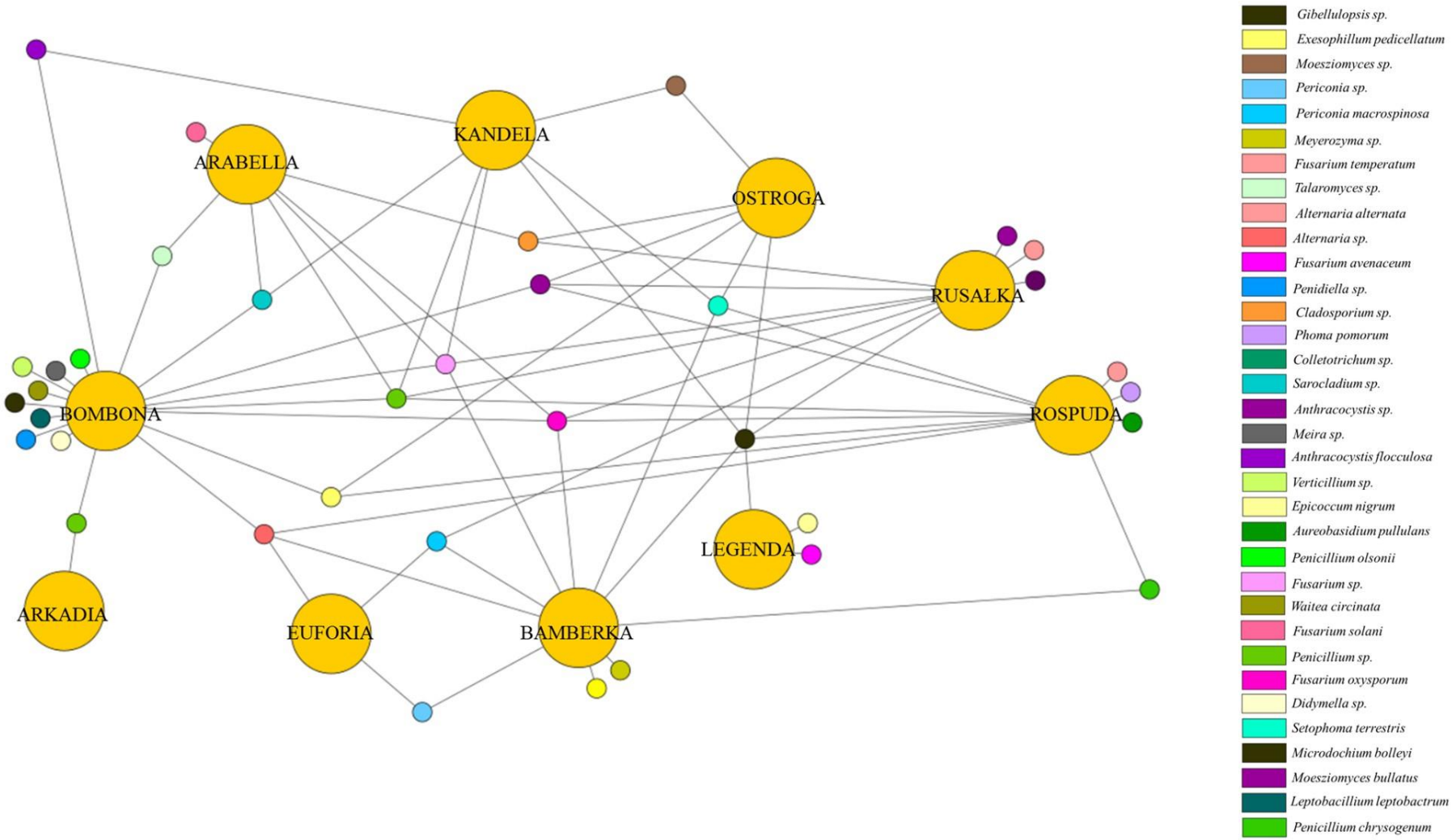
W warunkach polowych, w uprawie tradycyjnej (Rycina nr 13) w odmianie jarej Arabella zidentyfikowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Fusarium, Penicillium, Talaromyces* oraz *E. pedicellatum, F. oxysporum* i *W. circinata*. z pszenicy odmiany Arkadia wyizolowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Anthracocysits, Fusarium Moesziomyces, Penicillium, Perionia, Trichoderma* oraz A. *flocculosa, E. pedicellatum, F. avenaceum, F. poae, M. bolleyi, P. macrospinosa, P. eupyrena, S. terrestris, S. vesicarium*. w pszenicy odmiany Bamberka zaobserwowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Backusella, Fusarium, Neonectria, Phoma, Penicillium, Setophoma* oraz *E. pedicellatum, F. oxysporum, F. redolens, M. bolleyi, P. chrysogenum, P. macrospinosa, S. terrestris*. z pszenicy odmiany jarej Bombona wyizolowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Fusarium, Penicillium, Sarocladium* oraz A. *alternata, E. pedicellatum, F. oxysporum, F. solani, P. crustosum*. w pszenicy odmiany Euforia występują grzyby z rodzaju *Alternaria, Cladosporium, Fusarium, Lecanicillium, Microdochium, Phoma, Sarocladium* oraz *E. pedicellatum, F. avenaceum, F. redolens, F. oxysporum, F. poae, M. bolleyi, P. macrospinosa, S. terrestris*. z pszenicy odmiany Kandela wyizolowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Anthracocystis Fusarium, Penicillium, Phoma, Sarocladium* oraz A. *infectoria, B. sorokiniana, E. pedicellatum, F. oxysporum, F. proliferatum, F. redolens, M. bolleyi, P. macrospinosa, P. pomorum, S. terrestris*. z pszenicy odmiany Legenda wyizolowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Cadophora, Epicoccum, Fusarium, Periconia, Phoma, Penicillium, Setophoma* oraz *E. pedicellatum, F. avenaceum, F. oxysporum, F. poae, F. redolens, M. bolleyi, N. gorlenkoana, P. macrospinosa, P. amphipolaria, R. solani, S. strictum, S. terrestris*. w pszenicy odmiany Ostroga zidentyfikowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Cladosporium, Fusarium, Penicillium* oraz *F. oxysporum, F. redolens, P. macrospinosa, S. terrestris. w* pszenicy odmiany Rospuda

występują grzyby z rodzaju *Alternaria, Anthracocystis, Arthrinium, Chaetomium, Cladosporium, Fusarium, Moesziomyces, Penicillium, Periconia* oraz A. *flocculosa, A. conjuncta, A. infectoria, C. allicinum, E. pedicellatum, F. solani, F. oxysporum, P. macrospinosa, P. pomorum, S. terrestris*. z pszenicy odmiana Rusałka wyizolowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Cladosporium, Fusarium, Penicillium, Trichoderma* oraz A. *infectoria, A. alternata, A. pullulans, A. betulicola, D. pomorum, E. pedicellatum, I. farinosa, M. bolleyi, P. crustosum, P. macrospinosa, T. aculeatus S. bisbyi, S. strictum*.

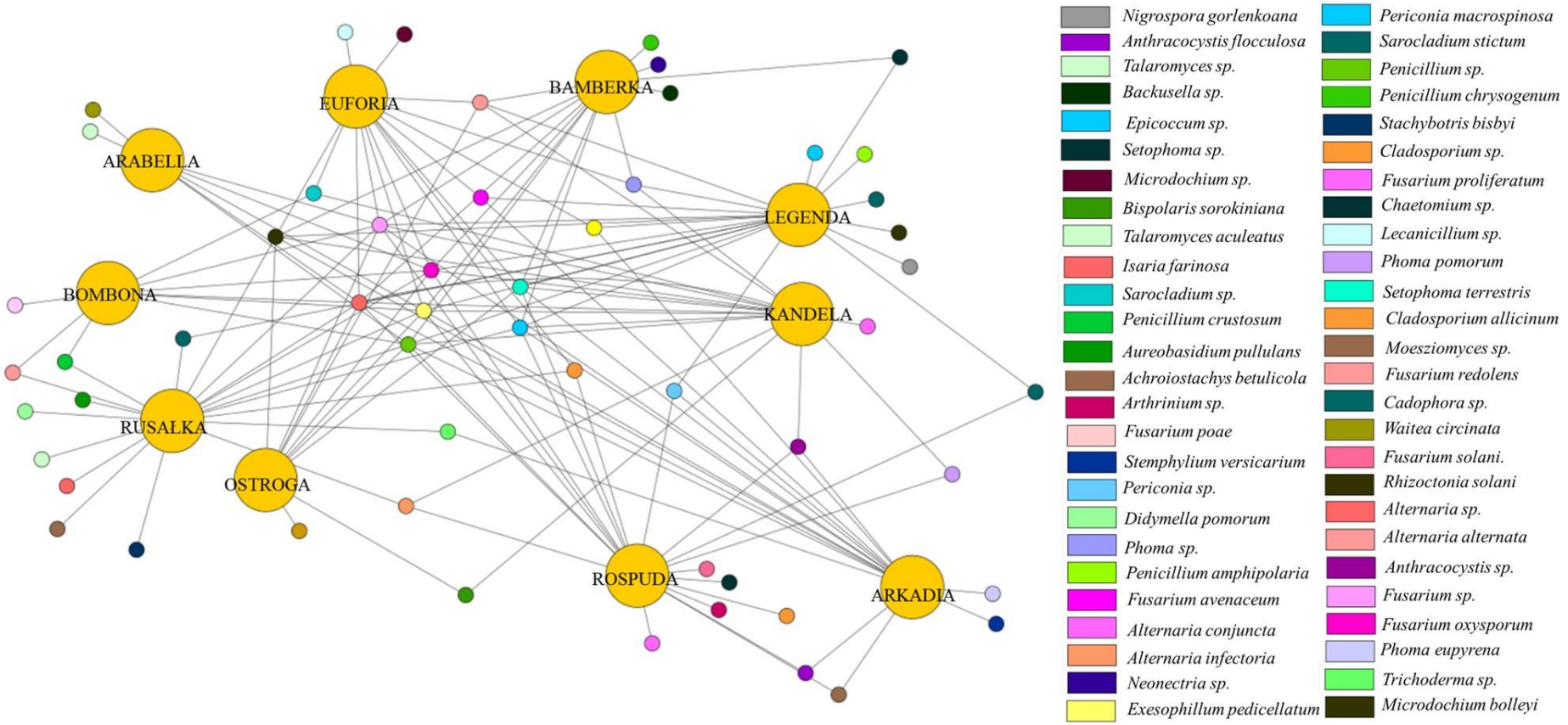
.



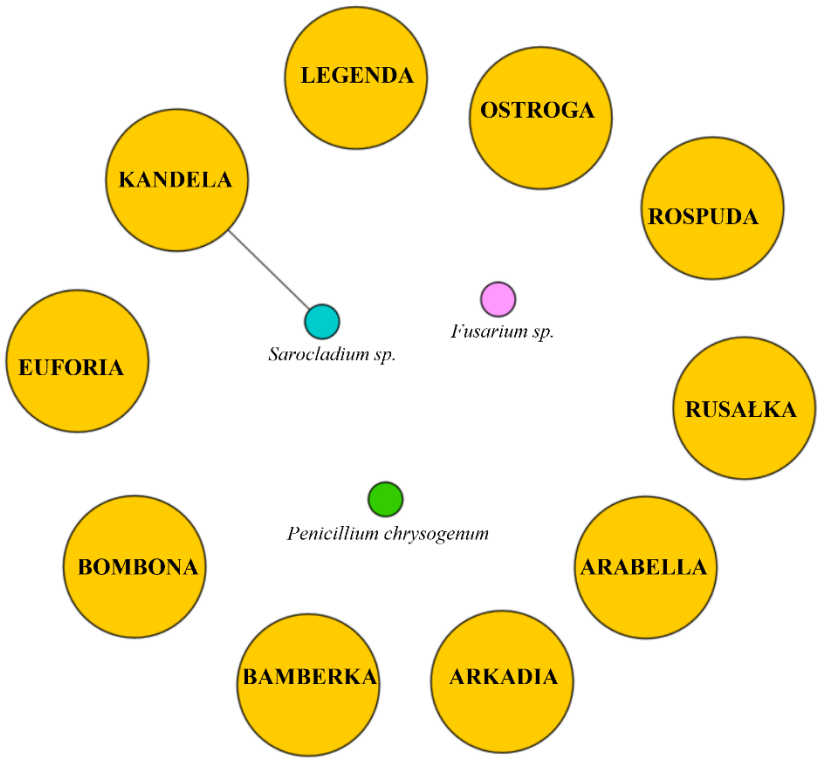
Rycina 11 Sieć powiązań wspólnych rodzajów/gatunków grzybów endofitycznych występujących w badanych odmianach pszenicy uprawianych w warunkach kontrolowanych



Rycina 12 Sieć powiązań wspólnych rodzajów/gatunków grzybów endofitycznych występujących w badanych odmianach pszenicy uprawianych w warunkach polowych - uprawa ekologiczna



Rycina 13 Sieć powiązań wspólnych rodzajów/gatunków grzybów endofitycznych występujących w badanych odmianach pszenicy uprawianych w warunkach polowych - uprawa tradycyjna



Rycina 14 Grzyby endofityczne występujące w każdej z badanych strategii uprawy.

Rycina 14 przedstawia analizę porównawczą mykobiomu dziesięciu odmian pszenicy w trzech strategiach uprawy: szklarnia oraz pole: uprawa tradycyjna i ekologiczna. Wykazano, że grzyby z rodzaju *Sarocladium* występują w każdej strategii uprawy w odmianie Kandela. Zaobserwowano również, że grzyby z rodzaju *Fusarium* oraz *Penicillium chrysogenum* występują w każdej strategii uprawy, niezależnie od odmiany pszenicy.

5.1.3. Wskaźniki bioróżnorodności dla badanych odmian pszenicy w różnych strategiach uprawy

Przeanalizowano wskaźniki bioróżnorodności (Indeks Shannon'a, Indeks Margalefa oraz Indeks Menhinick'a) i równomierności w badanych odmianach pszenicy z podziałem na strategie uprawy: szklarnia oraz pole (uprawa ekologiczna i tradycyjna) [Rycina nr 15].

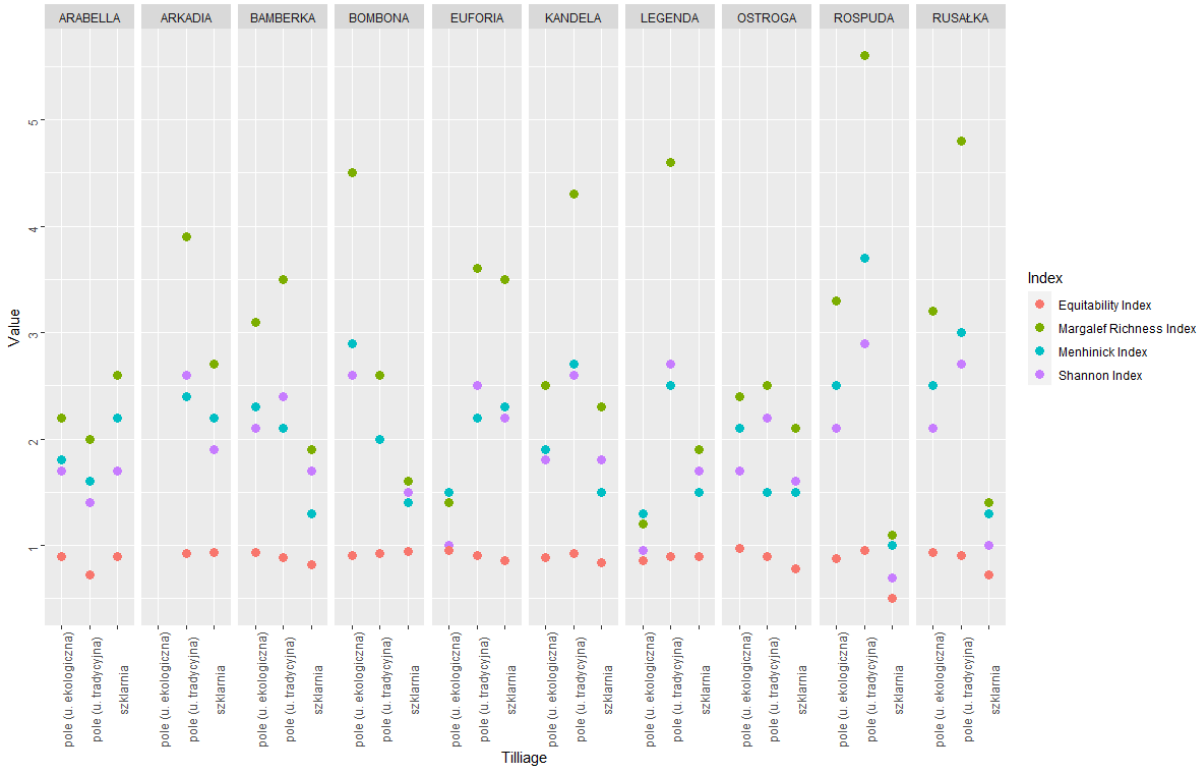
Pszenica ozima odmiany Euforia w warunkach szklarniowych charakteryzowała się największą bioróżnorodnością. Potwierdzają to wartości badanych wskaźników; indeks Shannon'a (H) wyniósł 2,20, indeks Margalefa (MRI) 3,50, a indeks Menhinick'a (d) 2,30. Natomiast wartości tych wskaźników były najniższe w odmianie jarej Rospuda (H= 0,69, MRI = 1,10, d = 1). Wartości rozmieszczenia gatunkowego (E) wahały się od E=0,94 dla odmiany Bombona do E=0,50 dla odmiany Rospuda.

W warunkach polowych w uprawie tradycyjnej odmiana Rospuda charakteryzowała się nie tylko największą bioróżnorodnością (H = 2,90; MRI = 5,60; d = 3,70), ale też najlepszym

rozmieszczeniem gatunkowym (E = 0,95). Wartości indeksu Shannon'a (H = 1,40) oraz indeksu Margalef'a (MRI = 2,0) w odmianie Arabella były najniższe, natomiast wartości indeksu Menhenick'a (d = 1,50) były najniższe w odmianie Ostroga.

W uprawie ekologicznej nie podano wartości dla omawianych wskaźników przy odmianie Arkadia, ponieważ wyizolowano tylko *Penicillium olsonii* (Ryc. S1). Spośród pozostałych odmian, Bombona charakteryzuje się największą bioróżnorodnością (H = 2,60; MRI = 4,50; d = 2,90) oraz dobrym rozmieszczeniem gatunkowym (E = 0,91). Odmiana Legenda była najbardziej uboga w poszukiwane mikroorganizmy (H = 2,60; MRI = 4,50; d = 2,90), a także charakteryzowała się najgorszym rozmieszczeniem gatunkowym (E = 0,86). Natomiast najbardziej równomierne rozmieszczenie gatunkowe zaobserwowano u odmiany Ostroga (E = 0,97).

Analizując wskaźniki pod względem sposobu uprawy, zauważono, że uprawa na polu w systemie tradycyjnym charakteryzowała się największą bioróżnorodnością (H = 2,90; MRI = 5,60; d = 3,70). Natomiast najbardziej ubogie w mikroorganizmy były rośliny uprawiane w warunkach szklarniowych (H = 2,20; MRI = 3,50; d= 2,30). Rozmieszczenie gatunkowe było porównywalne we wszystkich badanych systemach uprawy. Wahało się w przedziale od E=0,97 -uprawy polowej, ekologicznej do E=0,94 - warunków szklarniowych.



Rycina 15 Wskaźniki bioróżnorodności i równomierności dziesięciu odmian pszenicy w badanych systemach uprawy

5.1.4. Kształtowanie się struktury społeczności grzybów endofitycznych wyizolowanych z roślin pszenicy, zdeterminowane organem roślinny (ziarniaki, liście, łodygi, korzenie).

Rycina nr 16 (oraz Tabela nr S3) przedstawia sieć wzajemnych powiązań rodzajów bądź gatunków grzybów występujących w organach roślinnych (ziarniaki, liście, łodygi i korzenie) niezależnie od systemu uprawy.

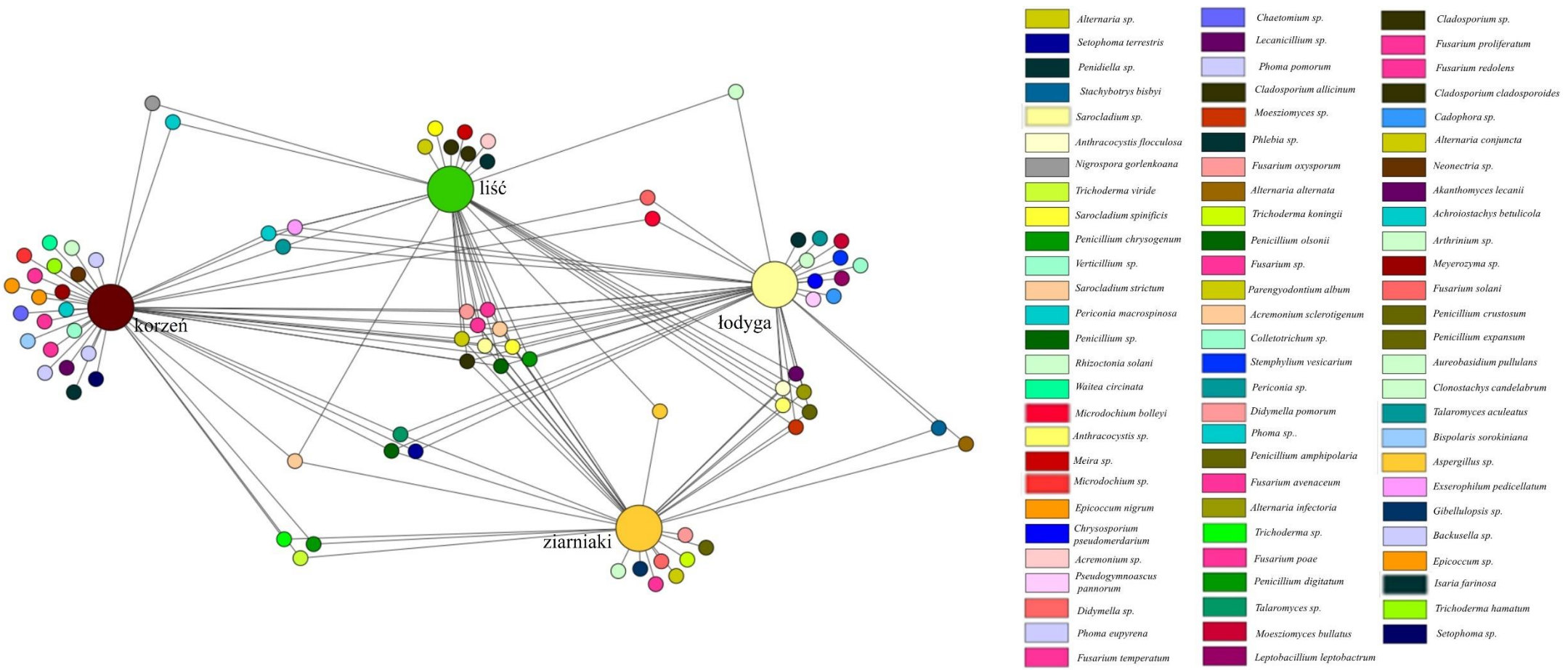
W ziarniakach stwierdzono występowanie grzybów z rodzaju *Alternaria, Anthracocystis, Cladosporium, Didymella, Fusarium, Gibellulopsis, Moesziomyces, Penicillium, Sarocladium, Talaromyces, Trichoderma* oraz A. *flocculosa, A. alternata, A. infactoria, A. sclerotigenum, A. lekanii, C. calndelabrum, D. pomorum, F. oxysporum, F. proliferatum, F. temperatum, P. crustosum, P. chrysogenum, P. digitatum, P. expansum, P. olsonii, P. album, S. bisbyi, S. spinificis, S. strictum, T. koningii, T. viride.*

W liściach zidentyfikowano grzyby z rodzaju *Acremonium, Alternaria, Anthracocystis, Aspergillus, Cladosporium, Fusarium, Meira, Moesziomyces, Penidiella, Periconia, Phoma, Penicillium, Sarocladium* oraz A. *sclerotigenum, A. lecanii, A. infectoria, A. conjuncta, A. pullulans, A. flocculosa, C. cladosporoides, C. allicunum, E. pedicellatum, F. oxysporum, F. proliferatum, N. gorlenkoana, P. chrysogenum, P. crustosum, P. amphipolaria, P. macrospinosa, S. spinificis, S. stritum*.

W łodygach zaobserwowano występowanie grzybów z rodzaju *Alternaria, Anthracocystis, Cadophora, Cladosporium, Fusarium, Moesziomyces, Phlebia, Penicillium, Periconia, Sarocladium, Talaromyces, Verticillium* oraz A. *infectoria, A. alternata, A. lecanii, A. flocculosa, A. pullulans, C. pseudomerdarium, E. pedicellatum, F. oxysporum, F. proliferatum, F. solani, L. leptobactrum, M. bullatus, M. bolleyi, P. pannorum, P. crustosum, P. chrysogenum, P. olsonii, P. macrospinosa, R. solani S. spinificis, S. strictum, S. bisbyi, S. versicarium, S. terrestris, T. aculeatus*.

Z korzeni roślin pszenicy pozyskano grzyby z rodzaju *Alternaria, Arthrinium, Backusella, Chaetomium, Cladosporium, Colletotrichum, Epicoccum, Fusarium, Lecanicillium, Meyerozyma, Microdochium, Neonectria, Periconia, Penicillium, Phoma, Setophoma, Sarocladium, Talaromyces, Trichoderma* oraz A. *betulicola, A. sclerotigenum, B. sorokiniana, E. nigrum, E. pedicellatum, F. oxysporum, F. proliferatum, F. avenaceum, F. poae, F. redolens, F. solani, I. farinosa, M. bolleyi, N. gorlenkoana, P. digitatum,*

P. chrysogenum, P. olsonii, P. macrospinosa, P. pomorum, P. eupyrena, S. spinificis, S. strictum, S. terrestris, T. viride, T. hamatum, W. circinata.



Rycina 16 Sieć powiązań wspólnych rodzajów/gatunków grzybów endofitycznych występujących w poszczególnych organach rośliny.

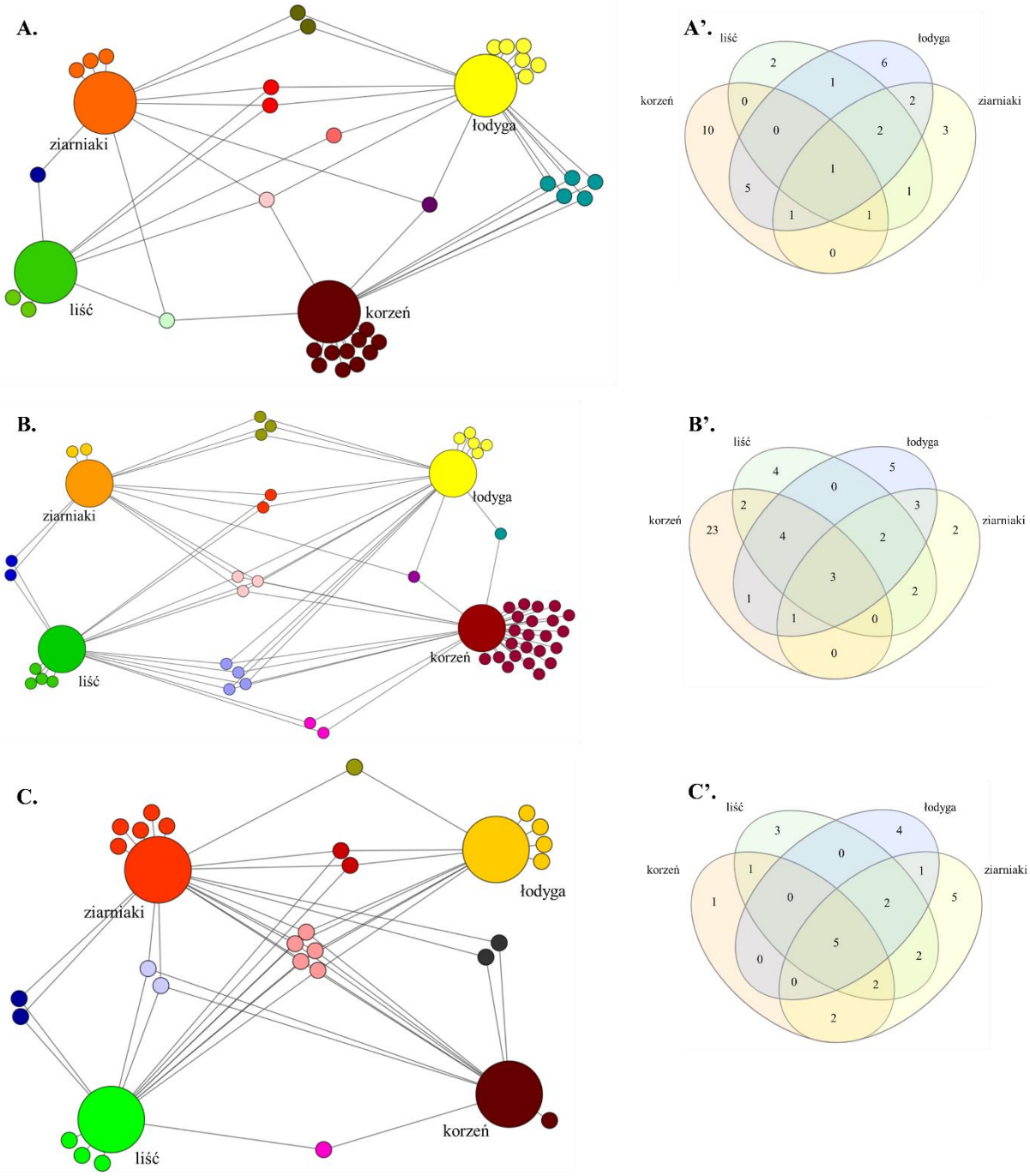
Określono ponadto strukturę społeczności grzybów w poszczególnych organach rośliny (ziarniakach, liściach, łodydze i korzeniu) dla kazdego systemu uprawy (Rycina 17).

W warunkach polowych, w uprawie ekologicznej (Rycina 17A), w ziarniakach zidentyfikowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Anthracocystis, Cladosporium, Didymella, Fusarium, Gibellulopsis, Moesziomyces, Penicillium, Sarocladium, Talaromyces* oraz *F. temperatum*. w liściach zidentyfikowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Anthracocystis, Cladosporium, Meira, Penicillium, Penidiella, Sarocladium* oraz A. *flocculosa*. w łodygach zidentyfikowano grzyby z rodzaju *Anthracocystis, Alternaria, Fusarium, Moesziomyces, Periconia, Sarocladium, Talaromyces, Verticillium* oraz A. *flocculosa, A. pullulans, A. alternata, F. solani, L. leptobactrum, M. bolleyi, M. bullatus, P. chrysogenum, P. macrospinosa, S. terrestris*. w korzeniach zidentyfikowano grzyby z rodzaju *Colletotrichum, Fusarium, Meyerozyma, Penicillium, Sarocladium* oraz *E. nigrum, E. pedicellatum, F. oxysporum, F. solani, F. avenceum, M. bolleyi, P. olsonii, P. chrysogenum, P. pomorum, P. macrospinosa, S. terrestris, W. circinata*.

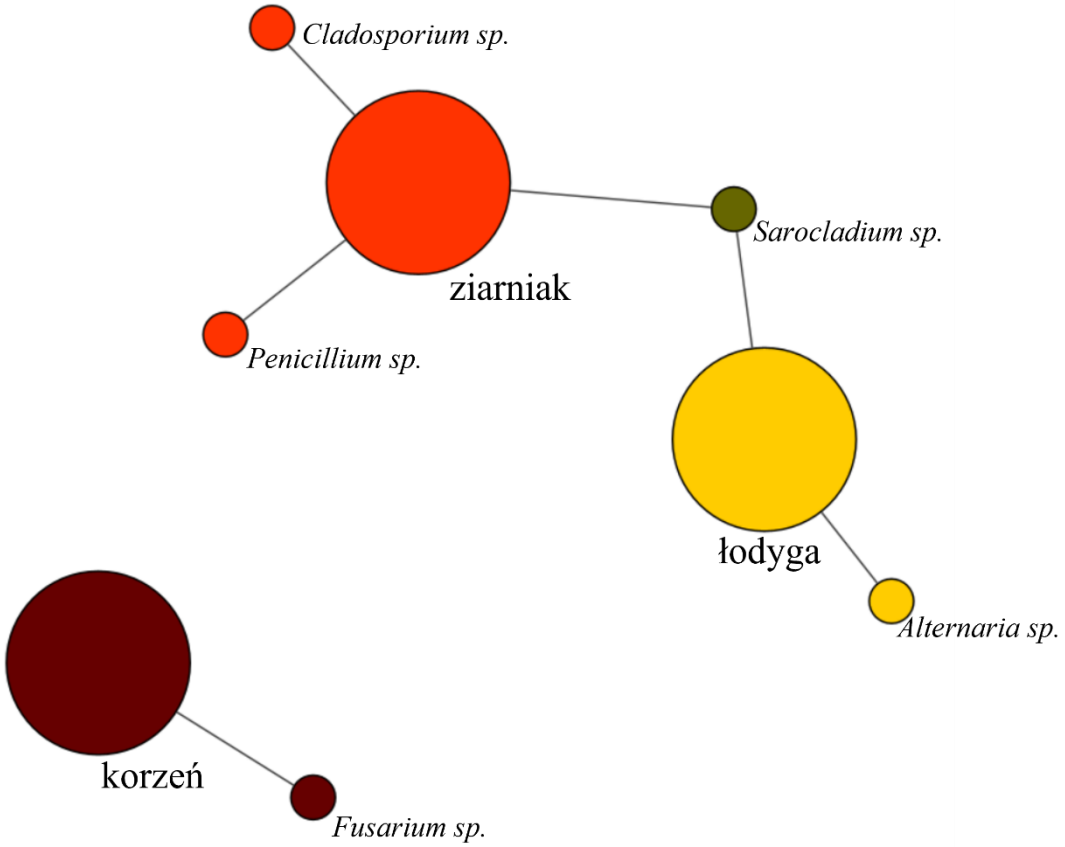
W warunkach polowych, w uprawie tradycyjnej (Rycina 17B), w ziarniakach zidentyfikowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Anthracocystis, Cladosporium, Moesziomyces, Penicillium, Sarocladium* oraz A. *flocculosa, A. alternata, A. infactoria, D. pomorum, F. oxysporum, P. crustosum, S. bisbyi*. w liściach zidentyfikowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Anthracocystis, Fusarium, Moesziomyces, Periconia, Phoma* oraz A. *conjuncta, A. infactoria, A. pullulans, C. allicinum, E. pedicellatum, F. oxysporum, P. amphipolaria, P. crustosum, P. macrospinosa, S. strictum*. w łodydze zidentyfikowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Anthracocystis, Cladosporium, Cadophora, Fusarium, Penicillium, Sarocladium* oraz A. *alternata, A. infactoria, E. pedicellatum, F. oxysporum, M. bolleyi, P. macrospinosa, P. chrysogenum, R. solani, S. strictum, S. vesicarium, S. bisbyi, T. aculeatus*. w korzeniu zidentyfikowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Arthrinium, Backusella, Cladosporium, Chaetomium, Epicoccum, Fusarium, Lecanicillium, Microdochium, Neonectria, Penicillium, Periconia, Phoma, Setophoma, Talaromyces, Trichoderma* oraz A. *betulicola, B. sorokiniana, E. pedicellatum, F. avenaceum, F. oxysporum, F. proliferatum, F. poae, F. redolens, F. solani, I. farinosa, M. bolleyi, N. gorlenkoana, P. macrospinosa, P. eupyrena, P. pomorum, S. terrestris, S. strictum, W. circinata*.

W warunkach kontrolowanych (Rycina 17C), w ziarniakach zidentyfikowano grzyby z rodzaju *Aspergillus, Cladosporium, Penicillium, Sarocladium, Trichoderma* oraz

A. *sclerotigenum, A. lecanii, C. candelabrum, F. rpoliferatum, P. crustosum, P. chrysogenum, P. expansum, P. olsonii, P. digitatum, P. album, S. spinificis, S. strictum, T. koningii, T. viride*. w liściach zidentyfikowano grzyby z rodzaju *Acremonium, Aspergillus, Fusarium, Sarocladium* oraz A. *sclerotigenum, A. lecanii, C. cladosporoides, F. proliferatum, N. gorlenkoana, P. crustosum, P. chrysogenum, S. spinificis*. w łodygach zidentyfikowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Penicillium, Phlebia, Sarocladium* oraz A. *lecanii, C. pseudomerdarium, F. proliferatum, P. crustosum, P. olsonii, P. pannorum S. spinificis, S. strictum*. w korzeniach zidentyfikowano grzyby z rodzaju *Fusarium, Penicillium, Sarocladium, Trichoderma* oraz A. *sclerotigenum, F. proliferatum, P. digitatum, P. olsonii, S. spinificis, T. hamatum, T. viride*.



Rycina 17 Sieć powiązań wspólnych rodzajów/gatunków grzybów endofitycznych występujących w poszczególnych organach rośliny uprawianych na polu w systemie ekologicznym (A) i tradycyjnym (B) oraz w warunkach kontrolowanych (C); diagram Venna obrazujący unikalny i wspólny mykobiom poszczególnych organów pszenicy uprawianej na polu w systemie ekologicznym (A') i tradycyjnym (B') oraz w warunkach kontrolowanych (C').



Rycina 18 Grzyby endofityczne występujące w tych samych częściach rośliny w każdej z badanych strategii uprawy.

Dokonano również porównania struktury społeczności grzybów dla każdego organu roślinnego i każdego systemu uprawy (warunki kontrolowane, warunki polowe: uprawa ekologiczna i tradycyjna). Na Rycinie 18 przedstawiono grzyby występujące w każdym systemie uprawy, w tej samej części rośliny. Grzyby z rodzaju *Fusarium* zaobserwowano w korzeniach roślin uprawianych w szklarni oraz w warunkach polowych w obu systemach uprawy (ekologicznej i tradycyjnej). Grzyby z rodzaju *Sarocladium* występowały w ziarniakach i łodydze roślin, natomiast grzyby z rodzaju *Alternaria* występowały tylko w łodydze, a grzyby z rodzaju *Penicillium* i *Cladosporium* tylko w ziarniakach.

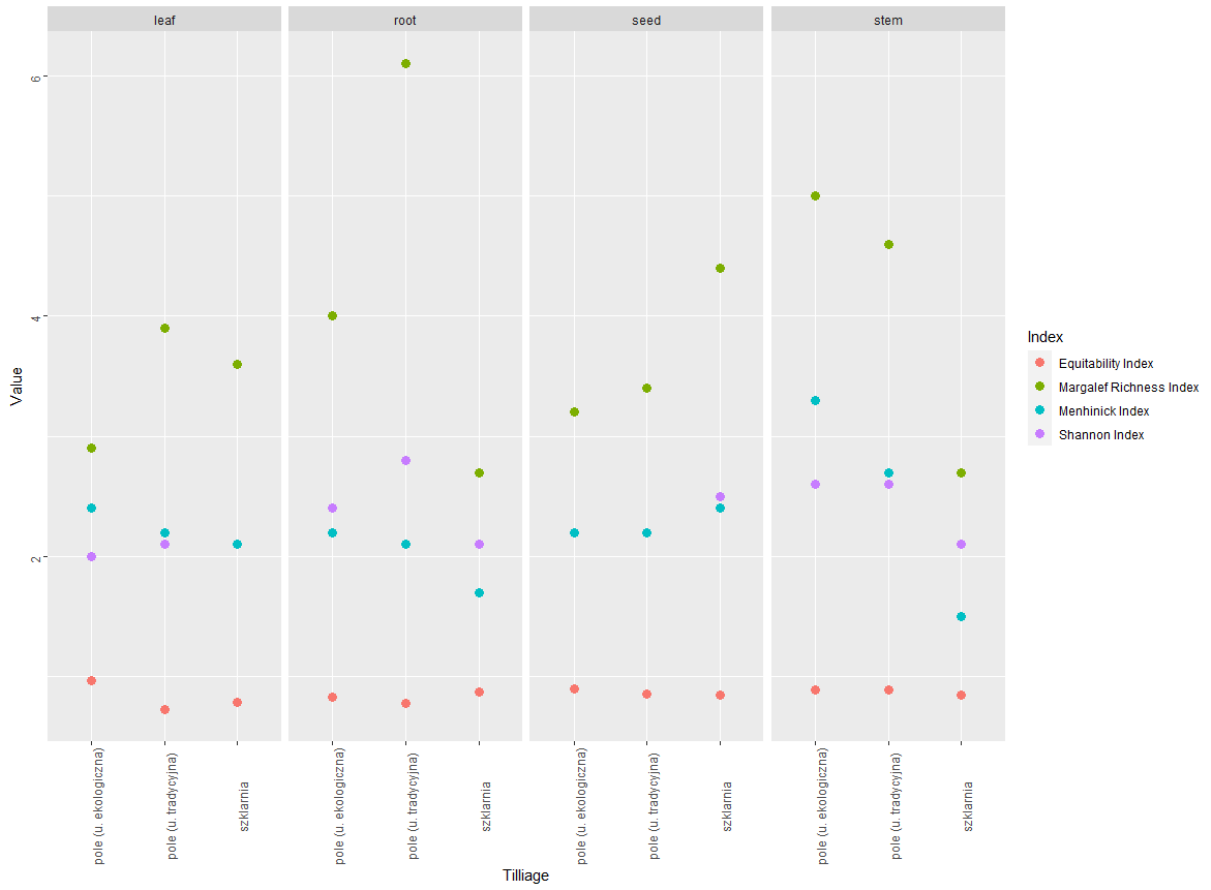
5.1.5. Wskaźniki bioróżnorodności dla organów roślinnych w różnych strategiach uprawy

Określono również wskaźników bioróżnorodności i równomierności dla organów roślin w badanych systemach uprawy (Tab. S2, Ryc. 19). w warunkach kontrolowanych, w szklarni, wartości indeksu Shannon'a wahały się od 2,50 do 2,10. Najwyższe wartości otrzymano analizując ziarniaki, natomiast wartości uzyskane dla pozostałych organów - liście, łodygi i korzenie były takie same. Wartości indeksu Margalef'a kształtowały się w przedziale: 4,40 – 2,70, a wartości indeksu Menhinick'a w przedziale: 2,40 – 1,50. Najwyższe wartości indeksu

Maralef'a oraz Menhinick'a osiągnięto analizując szczepy grzybów wyizolowane z ziarniaków, odpowiednio MRI = 4,40 oraz d = 2,40. Najniższe wartości indeksu Margalef'a osiągnięto dla endofitów bytujących w korzeniach i łodydze, a najniższe wartości indeksu Menhinick'a w łodydze. Na podstawie tych wartości stwierdzono, że ziarniaki charakteryzują się największą bioróżnorodnością, a łodyga jest najbardziej ubogą częścią rośliny w badane mikroorganizmy. Natomiast najlepszym rozmieszczeniem gatunkowym (E=0,87) charakteryzowały się korzenie, a nierównomiernym - liście (E = 0,79)

W warunkach polowych, w uprawie tradycyjnej indeksy Shannon'a i Margalef'a miały największą wartość w korzeniu, odpowiednio H = 2,80 i MRI = 6,10. Natomiast według indeksu Menhinick'a (d = 2,70) łodyga była najbardziej bogatą w mikroorganizmy częścią rośliny i charakteryzowała się najlepszym rozmieszczeniem gatunkowym (E = 0,89). Analizując wartości badanych indeksów nie można jednoznacznie stwierdzić, która część rośliny była najbardziej uboga w mikroorganizmy. Każdy z indeksów wskazuje inną część rośliny. Wartości indeksu Shannon'a były najniższe w liściu (H=2,1), indeksu Margalef'a w ziarniakach (MRI=3,40), natomiast indeksu Menhinick'a w korzeniu. w tej części rośliny zaobserwowano również najniższą wartość wskaźnika opisującego rozmieszczenie gatunkowe (E=0,83).

W warunkach polowych, w uprawie ekologicznej wartości indeksu Shannon'a mieściły się w przedziale: 2,60 - 2,0, indeksu Margalef'a w przedziale: 5-2,9, a wartości indeksu Menhinick'a w przedziale: 3,30-2,20. Po przeanalizowaniu podanych wartości, zaobserwowano, że łodyga jest najbardziej bogatą w mikroorganizmy częścią rośliny (H = 2,60; MRI = 5; d = 3,30). Natomiast liść był najbardziej ubogą częścią rośliny (H = 2; MRI = 2,9), ale charakteryzował się najlepszym rozmieszczeniem gatunkowym (E = 0,97).



Rycina 19 Wskaźniki bioróżnorodności i równomierności dla poszczególnych organów rośliny (ziarniak, liść, łodyga, korzeń) w badanych systemach uprawy

5.2 Doświadczenie nr 2

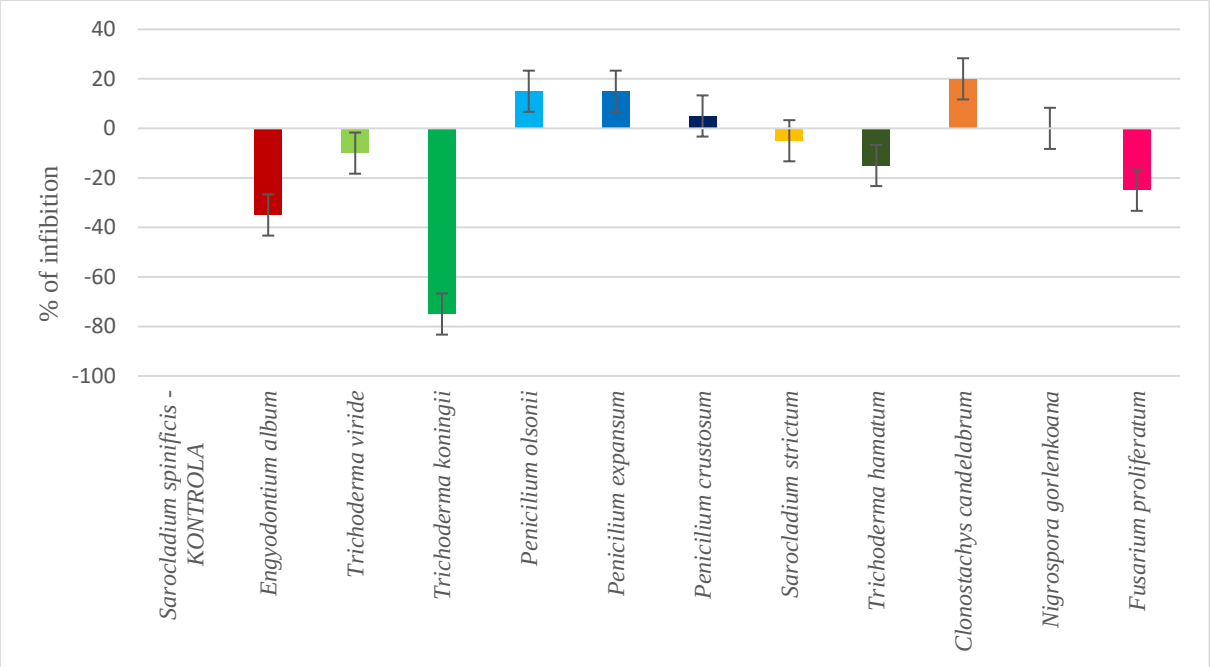
Doświadczenie nr 2 polegało na przeprowadzeniu testów biologicznych w systemie podwójnej kultury, na podłożu laboratoryjnym PDA z wykorzystaniem grzybów endofitycznych wyizolowanych i zidentyfikowanych w doświadczeniu nr 1 w warunkach kontrolowanych – szklarni. Analizowano interakcje izolatów względem siebie.

W doświadczeniu wykorzystano następujące szczepy grzybów: *Trichoderma viride* E80, *Trichoderma koningii* E191, *Trichoderma hamatum* E81, *Penicillium olsonii* E69_1, *Penicillium expansum* E193, *Penicillium crustosum* E106, *Sarocladium spinificis* E11, *Sarocladium strictum* E22, *Fusarium proliferatum* E202, *Parengyodontium album* E35, *Clonostachys candelabrum* E83, *Nigrospora golenkoana* E208.

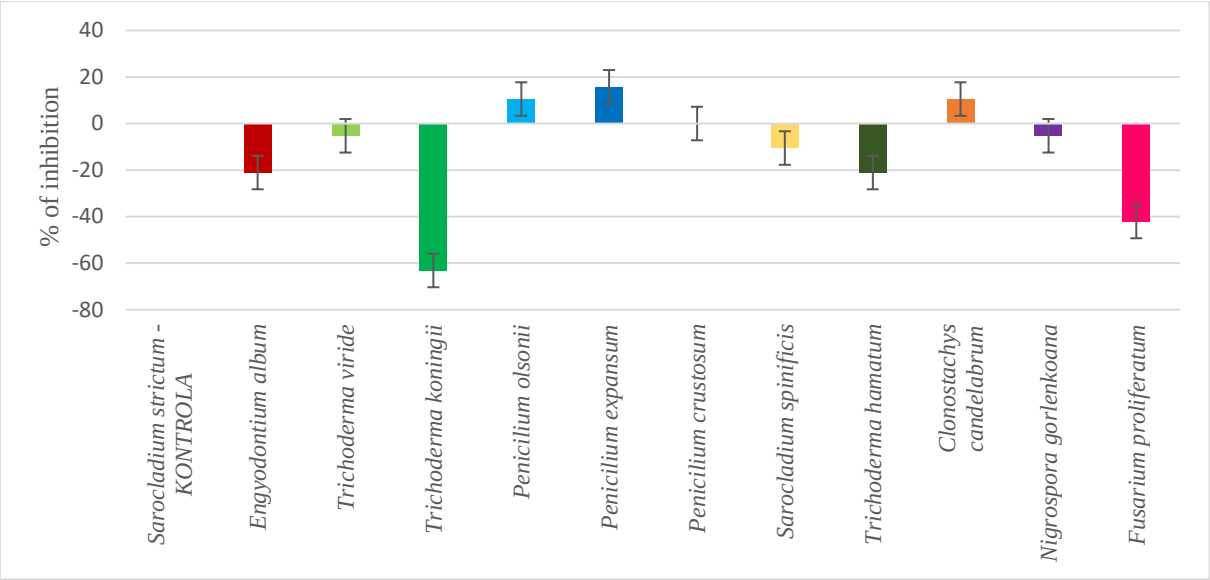
5.2.1 Ocena wpływu szczepu II na wzrost szczepu i - głównego w testach biologicznych na podłożu laboratoryjnym PDA

Obliczono procent inhibicji wzrostu szczepu i - głównego w obecności szczepu II (Tab. S1, Ryc. 20-) w piątym dniu ko-inkubacji na podłożu PDA

Grzyby z rodzaju *Trichoderma: T. viride, T. koningii, T. hamatum* oraz *F. proliferatum* i *P album* stymulowały wzrost grzybów z rodzaju *Sarocladium*: *S. spinificis* (Ryc. 20) oraz *S. strictum* (Ryc. 21). Wzrost obydwu tych gatunków był stymulowany przez grzyby z rodzaju Trichoderma, a a szczególnie T. koningii, podobnie podobnie stymulujący wpływ na wzrost grzybni miały te gatunki względem siebie. Jedynie grzyby z rodzaju *Penicillium*: P. *olsonii*, P. *expansum* P. *crustosum* oraz *C. candelabrum* wpływały hamująco na wzrost grzybni *S. spinificis* oraz *S. strictum*.

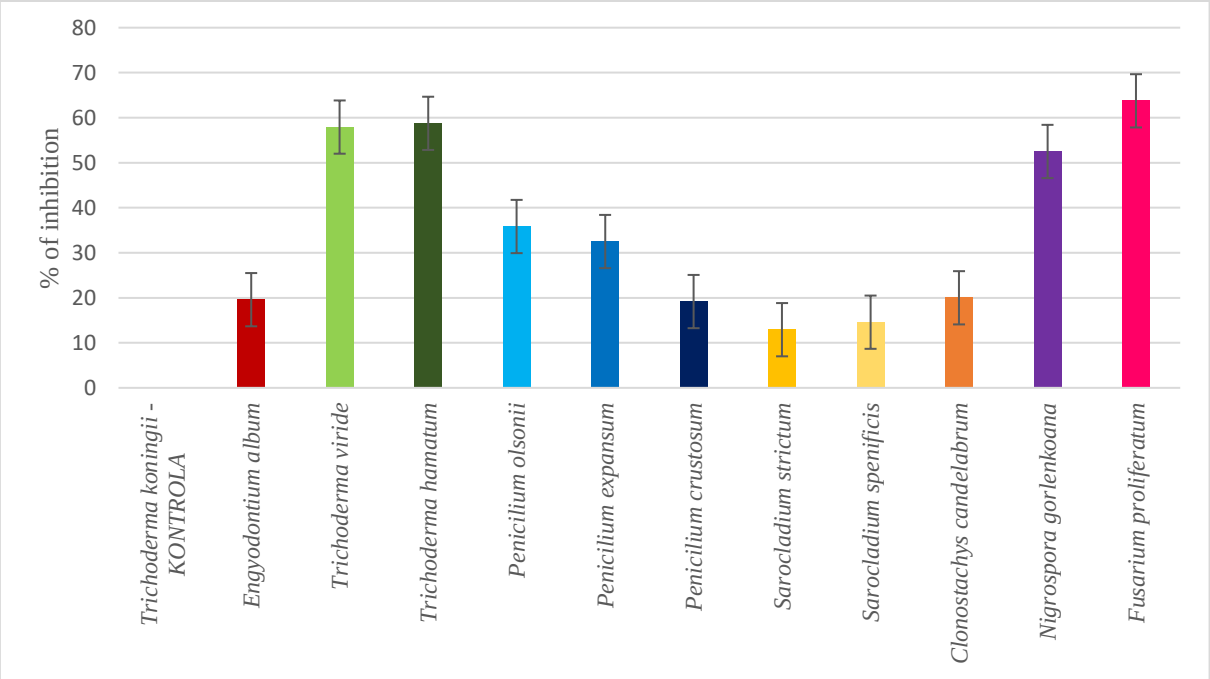


Rycina 20 Wpływ gatunku *F. proliferatum, P. album, T. hamatum, T. koningii, P. olsonii, P. expansum, P. crustosum, S. strictum, C. candelabrum, N. gorlenkoana, T. viride* na wzrost *S. spinificis* po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA.



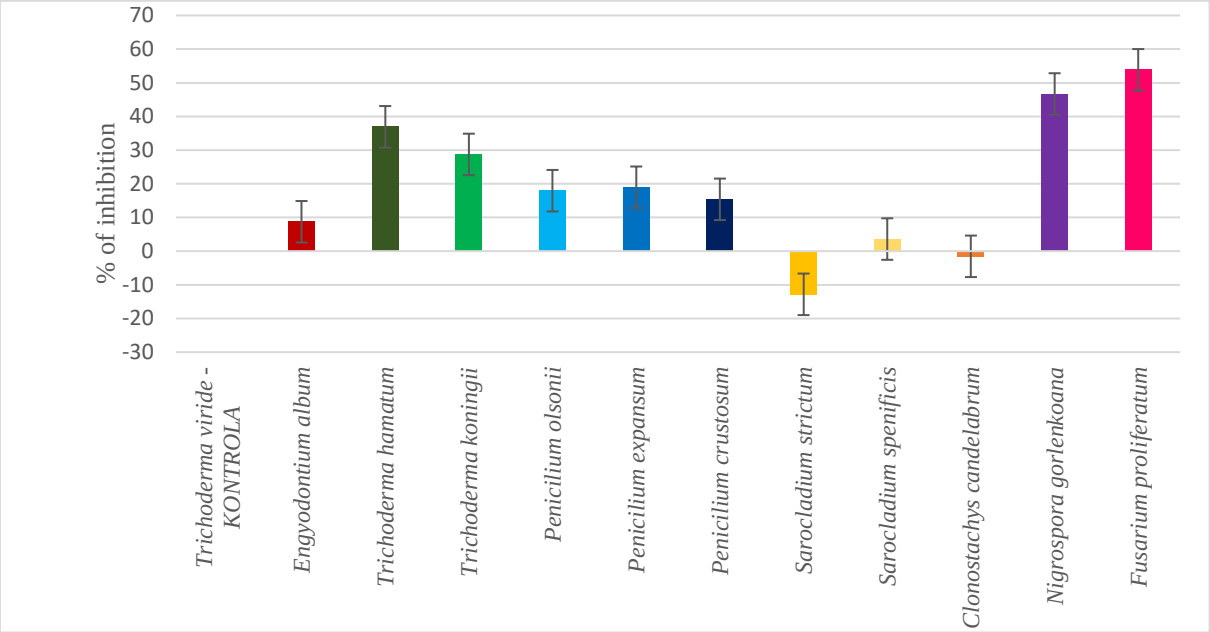
Rycina 21 Wpływ gatunku *F. proliferatum, P. album, T. hamatum, T. koningii, P. olsonii, P. expansum, P. crustosum, S. spinificis, C. candelabrum, N. gorlenkoana, T. viride* na wzrost *S. strictum* po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA.

Wszystkie badane grzyby hamowały wzrost grzybni *Trichoderma koningii*. Największy procent inhibicji wykazały szczepy z gatunku T. *viride*, T. *hamatum*, *F. proliferatum* i *N. gorlenkoana*. *Fusarium proliferatum* znacząco hamował (63,75%) wpływał na zahamowanie wzrostu grzybni T. *viride*. Niewielki wpływ na wzrostu grzybni T. *koningi* – w zakresie od 20% do 12,92% miały gatunki: *S. strictum, S. spinificis, P. album* oraz *C. candelabrum* (Ryc. 22).



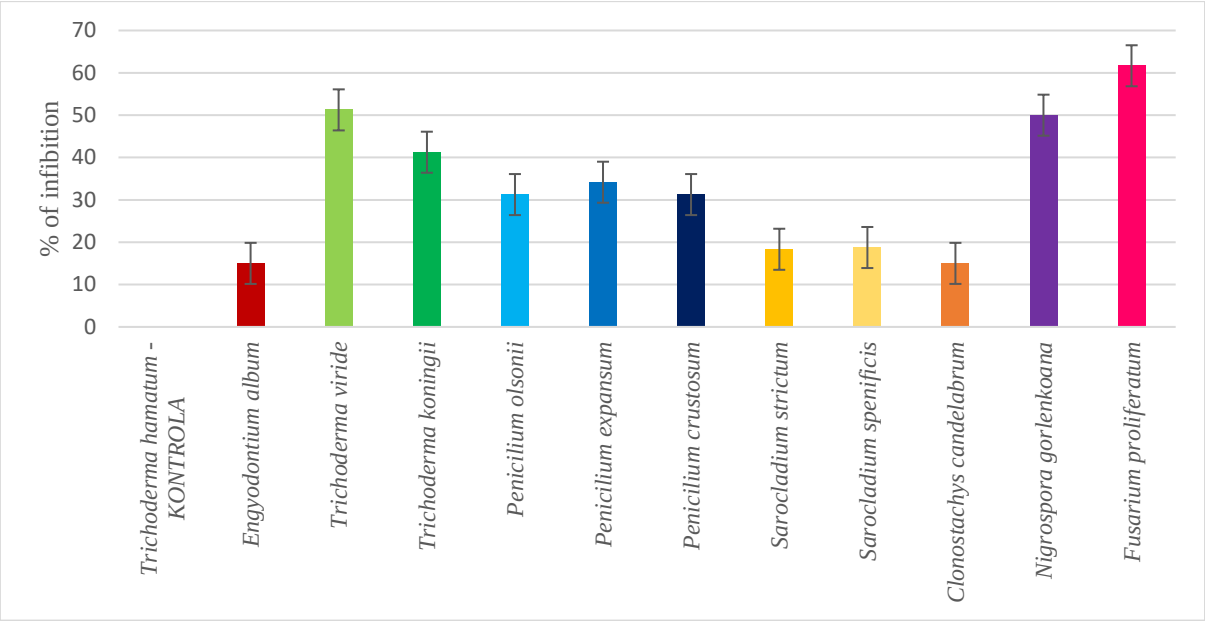
Rycina 22 Wpływ gatunku *F. proliferatum, P. album, T. hamatum, , P. olsonii, P. expansum, P. crustosum, S. spinificis, Sarocladium strictum C. candelabrum, N. gorlenkoana, T. viride* na wzrost T. *koningii* po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA

Szczepy *N. gorlenkoana* i *F. proliferatum* wpływały na zahamowanie wzrostu T. *viride* odpowiednio o 46,67% i 53,85%. Grzyby z rodzaju *Trichoderma* oraz z rodzaju *Penicillium* również hamowały wzrost grzybni T. *viride w* zakresie 18,98% - 15,38%. Niewielki wpływ na zahamowanie wzrostu T. *viride* miały gatunki P. *album* (8,72%) oraz *S. spinificis* (3,59%). Natomiast *S. strictum*, stymulował wzrost T. *viride* w 5 dniu ko-inkubacji w zakresie 12,82% (Ryc. 23).



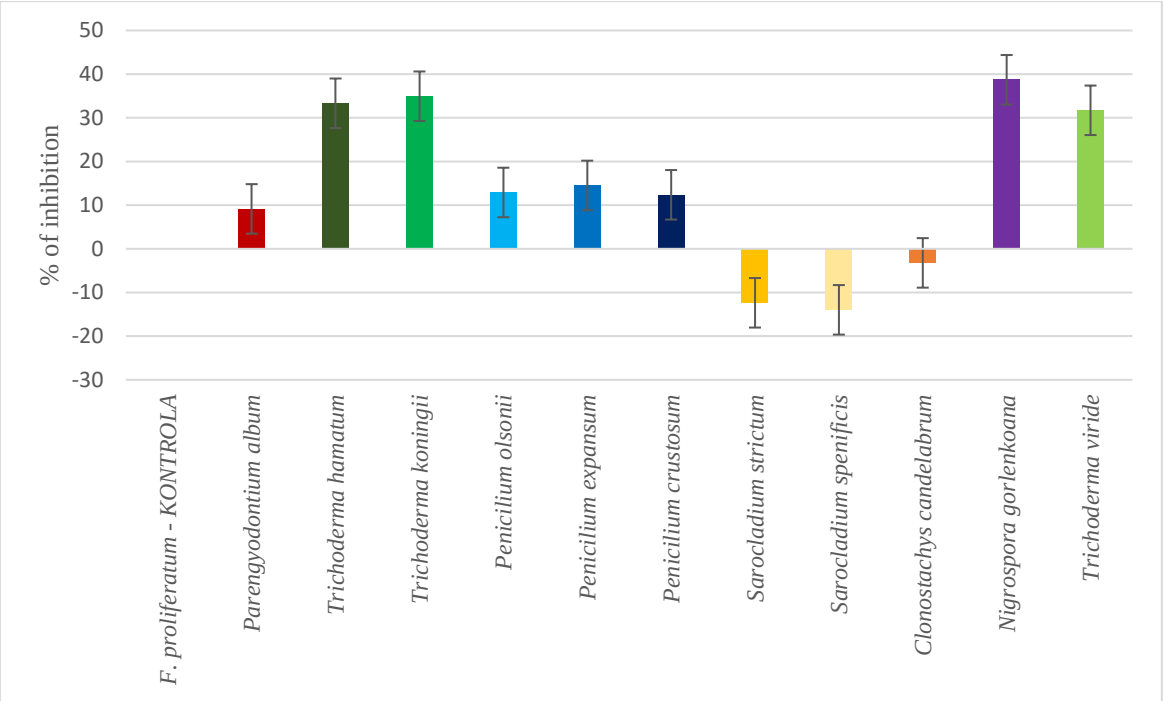
Rycina 23 Wpływ gatunku *F. proliferatum, P. album, T. hamatum, P. olsonii, P. expansum, P. crustosum, S. spinificis, Sarocladium strictum C. candelabrum, N. gorlenkoana, T. koningii* na wzrost T. *viride* po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA

Wszystkie badane grzyby hamowały wzrost grzybni *Trichoderma hamatum*. Największy procent inhibicji wykazały szczepy z gatunku T. *viride* (51,25%) oraz T. *koningii* (41,25%), a także *F. proliferatum (61,67%)* i *N. gorlenkoana* (50%). *Sarocladium strictum, S. spinificis, P. album* oraz *C. candelabrum* hamowały wzrost grzybni odpowiednio o 18,33.%, 18,75%, 15%, 15%. Grzyby z rodzaju *Penicillium* hamowały wzrost grzybni T. *hamatum w* zakresie 34,17% - 31,25% (Ryc. 24).



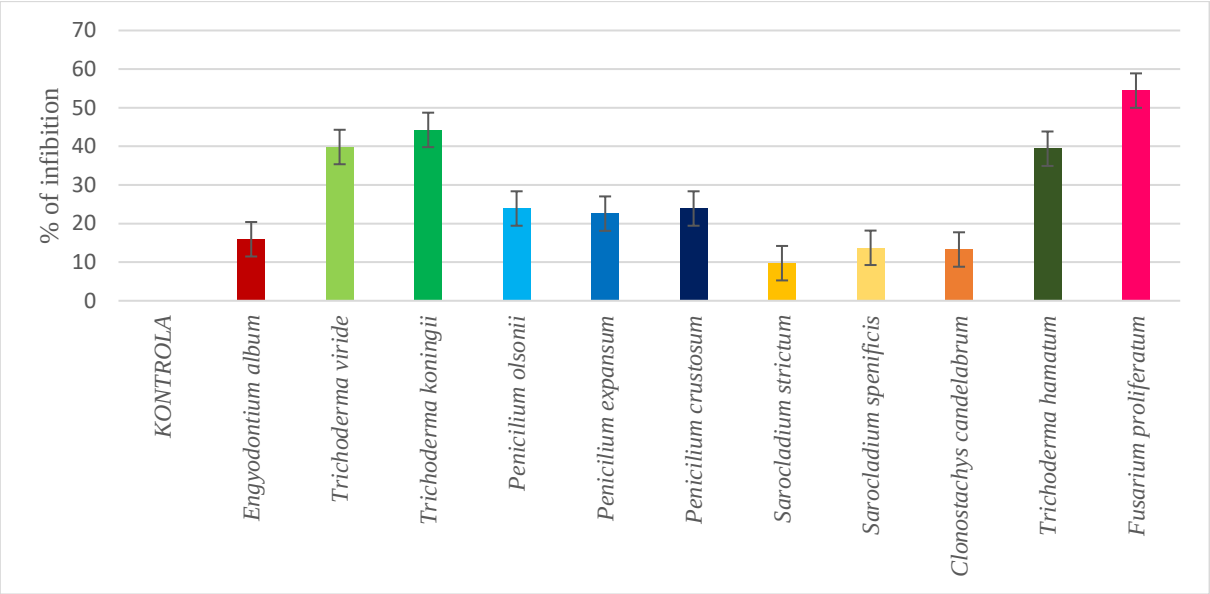
Rycina 24 Wpływ gatunku *F. proliferatum, P. album, T. viride, P. olsonii, P. expansum, P. crustosum, S. spinificis, Sarocladium strictum C. candelabrum, N. gorlenkoana, T. koningii* na wzrost T. *hamatum* po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA

Wzrost grzybni F. proliferatumnajefektywniej hamowały grzyby z rodzaju *Trichoderma* (w zakresie 34,95% - 31,72%) oraz *Penicillium* (w zakresie 14,51% - 12,37%), a także *N. gorlenkoana* (38,71%) najefektywniej hamowały wzrost grzybni *F. proliferatum*. w wyniku koinkubacji stymulująco na wzrost grzybni *F. proliferatum* wpływały grzyby z rodzaju *Sarocladium*: *S. spinificis* (13,98%) *i S. strictum* (12,37%), a także *C. candelabrum* (3,23%).



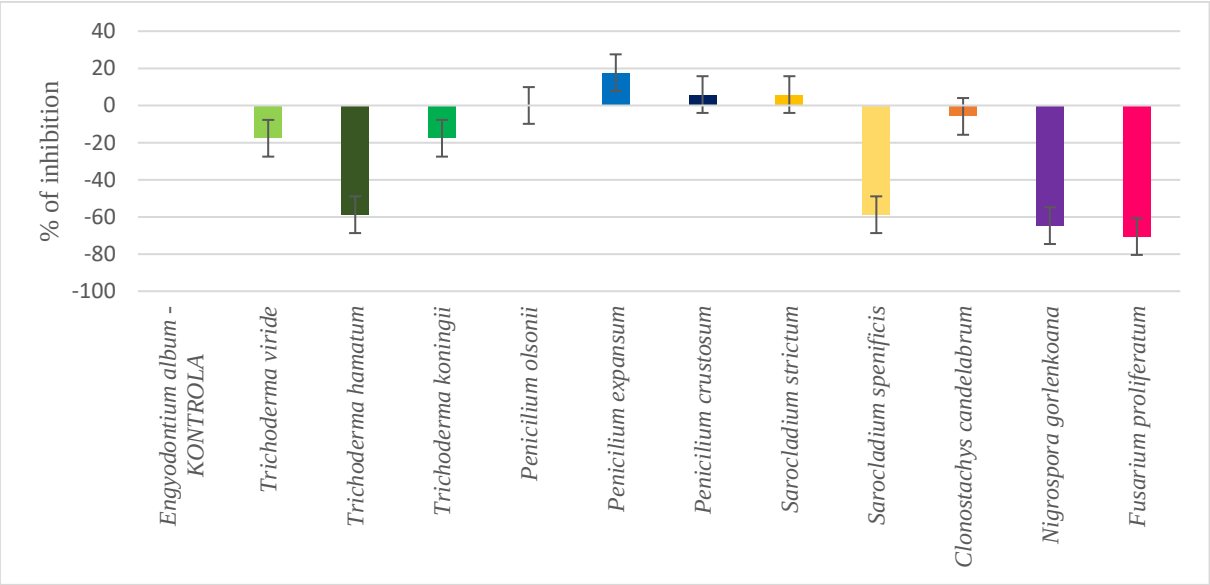
Rycina 25 Wpływ gatunku T. *hamatum, P. album, T. viride, P. olsonii, P. expansum, P. crustosum, S. spinificis, Sarocladium strictum C. candelabrum, N. gorlenkoana, T. koningii* na wzrost *F. proliferatum* po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA

Wszystkie badane grzyby hamowały wzrost grzybni *N. gorlenkoana*. Największy procent inhibicji odnotowano w przypadku grzybów z rodzaju *Trichoderma*: T. *viride* (39,82%), *T.hamatum* (39,38%) oraz T. *koningii* (44,25%), a także *F. proliferatum* (54,42%), natomiast najniższy w przypadku gatunków: *S. strictum* (9,73%), *S. spinificis* (13,72%), *P. album* (15,93%) oraz *C. candelabrum* (13,27%). Grzyby z rodzaju *Penicillium* hamowały wzrost grzybni *N. gorlenkoana* w zakresie 23,89% - 22,57% (Ryc. 26).



Rycina 26 Wpływ gatunku T. *hamatum, P. album, T. viride, P. olsonii, P. expansum, P. crustosum, S. spinificis, S. strictum C. candelabrum, F. proliferatum, T. koningii* na wzrost *N. gorlenkoana* po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA.

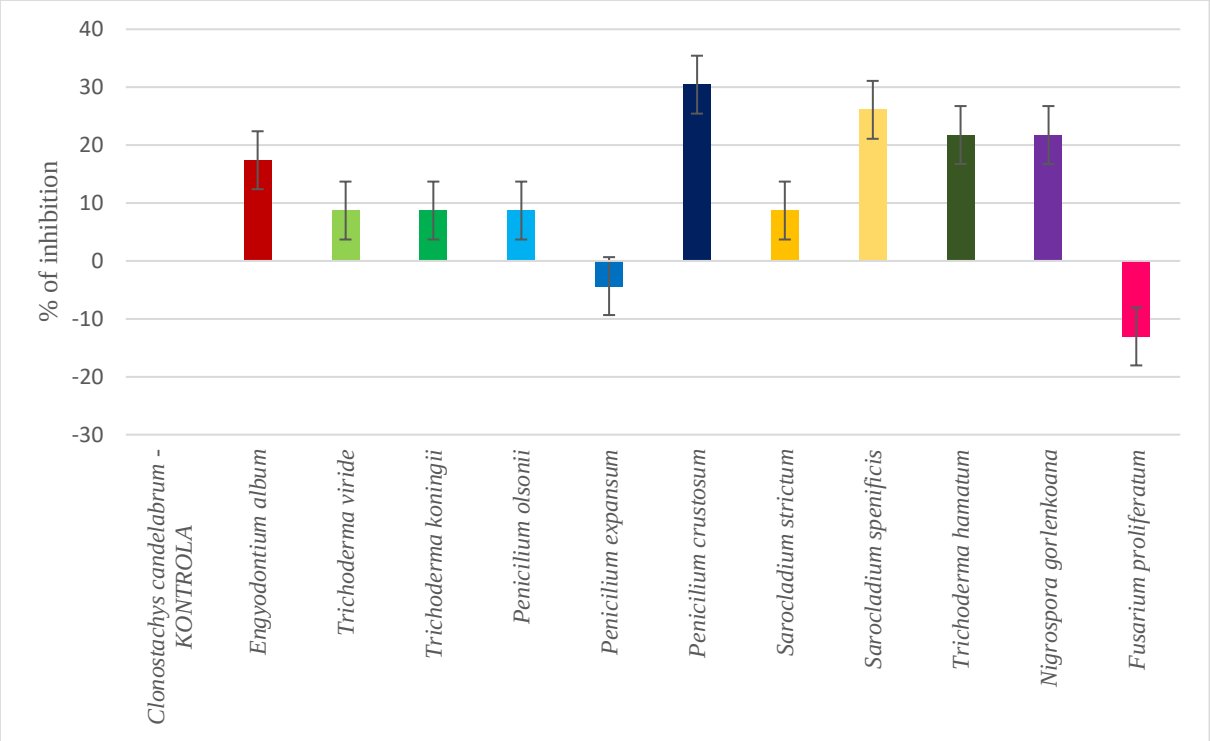
Szczepy z gatunku P. *expansum* oraz P. *crustosum* wpływały hamująco na wzrostu P. *album* w 5 dniu ko-inkubacji – w zakresie od 17,65% do 5,88%. Natomiast grzyby z rodzaju *Trichoderma*: T. *viride* (17,65%), *T. koningii* (17,65%), *T. hamatum* (58,82%), a także *F. proliferatum* (70,59%), *N. gorlenkoana* (64,71%) i *S. spinificis* (58,82%) wpływały stymulująco na wzrost grzybni P. *album* w bi-kulturach (Ryc. 27).



Rycina 27 Wpływ gatunku T. *hamatum, N. gorlenkoana, T. viride, P. olsonii, P. expansum, P. crustosum, S. spinificis, Sarocladium strictum C. candelabrum, F. proliferatum, T. koningii* na wzrost P. *album* po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA

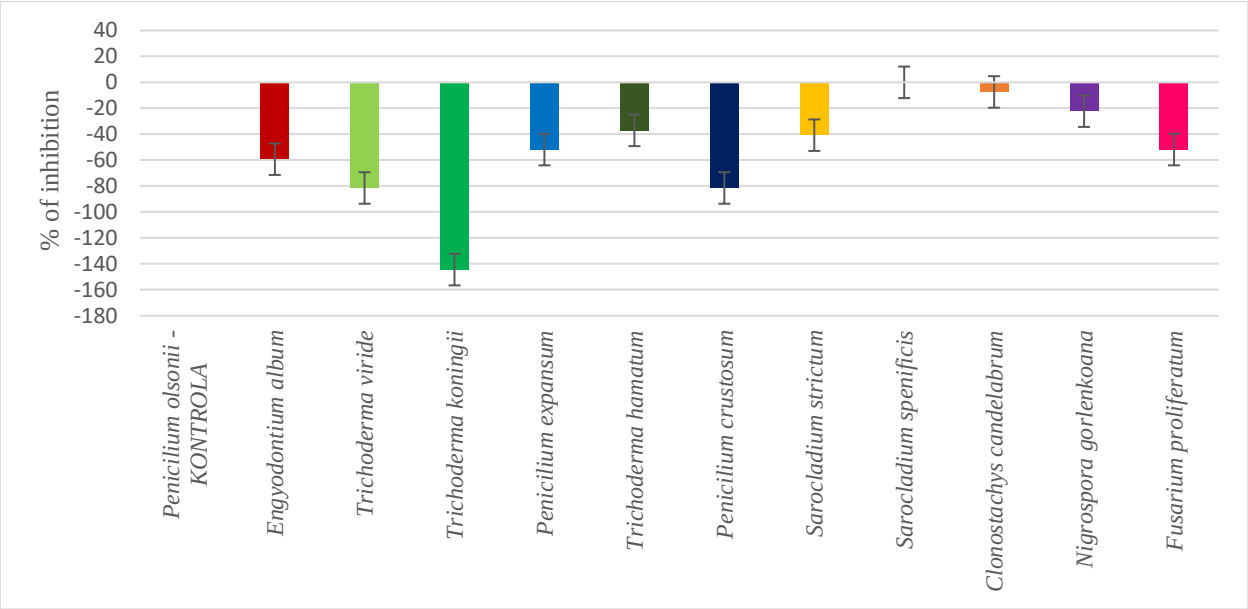
Wszystkie badane szczepy z wyjątkiem *F. proliferatum* i P. *expansum* hamowały wzrost *C. candelabrum*. Największy wpływ na zahamowanie wzrostu grzybni *C. candelabrum* w bi-

kulturach miały gatunki P. *crustosum* (30,43%) oraz *S. spinificis* (26,09%). Natomiast grzyby T. *viride*, T. *koningii* oraz P. *olsonii* hamowały wzrost *C. candelabrum* o 8,70% (Ryc. 28).

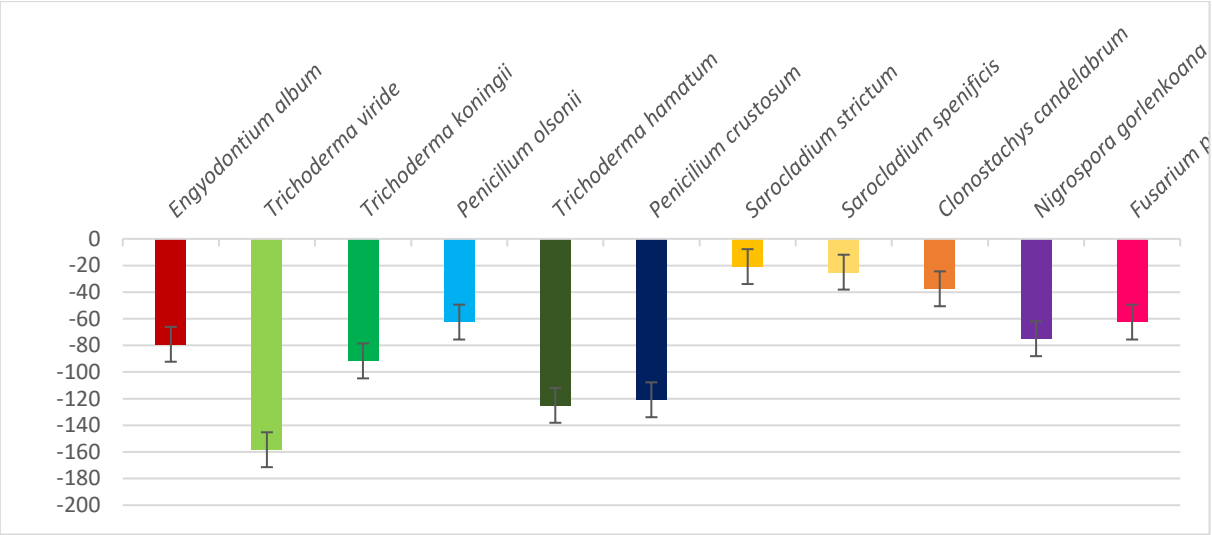


Rycina 28 Wpływ gatunku T. *hamatum, N. gorlenkoana, T. viride, P. olsonii, P. expansum, P. crustosum, S. spinificis, Sarocladium strictum, P. album, F. proliferatum, T. koningii* na wzrost *C. candelabrum* po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym

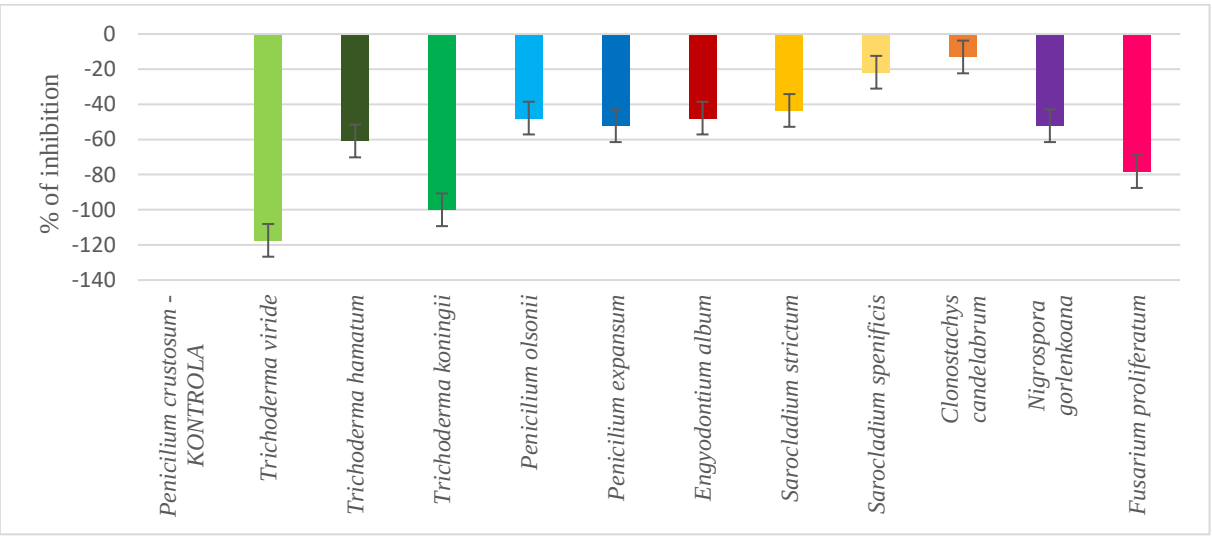
Wszystkie grzyby stymulowały wzrost grzybów z rodzaju *Penicillium - P.olsonii, P. expansum* oraz P. *crustosum* (Ryc. 29-31). w przypadku P. *olsonii* największy wpływ na wzrost grzybni szczepu z tego gatunku odnotowano *w* 5 dniu ko-inkubacji z T. *koningii* (Ryc. 29). w przypadku P. *expansum* stymulujący efekt wywołała obecność szczepu T. *viride* (Ryc. 30). Obydwa te gatunki *Trichoderma* stymulowały też znacząco wzrost P. *crustosum* (Ryc. 31).



Rycina 29 Wpływ gatunku *T. hamatum, N. gorlenkoana, T. viride, P. expansum, P. crustosum, S. spinificis, Sarocladium strictum, P. album, F. proliferatum, T. koningii, C. candelabrum* na wzrost *P. olsonii* po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA



Rycina 30 Wpływ gatunku T. *hamatum, N. gorlenkoana, T. viride, P. olsonii, P. crustosum, S. spinificis, Sarocladium strictum, P. album, F. proliferatum, T. koningii, C. candelabrum* na wzrost P. *expansum* po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA.



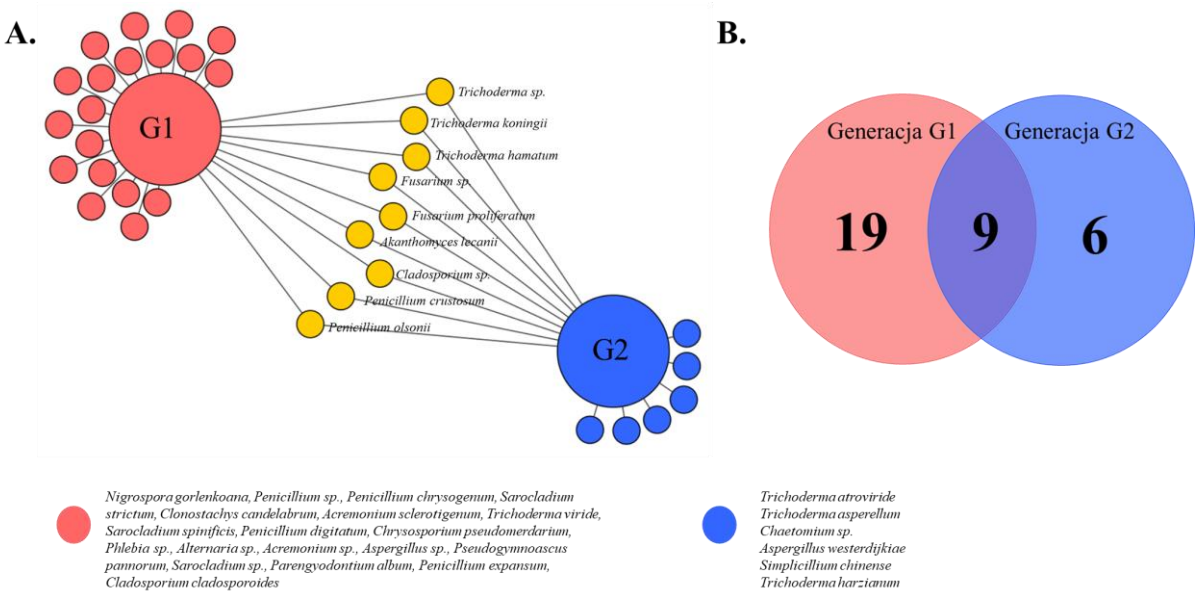
Rycina 31 Wpływ gatunku T. *hamatum, N. gorlenkoana, T. viride, P. olsonii, P. expansum, S. spinificis, Sarocladium strictum, P. album, F. proliferatum, T. koningii, C. candelabrum* na wzrost P. *crustosum* po 5 dniach ko-inkubacji na podłożu laboratoryjnym PDA.

5.3 Doświadczenie nr 3

Doświadczenie nr 3 polegało na analizie składu społeczności grzybów w dwóch generacjach roślin G1 i G2 wzrastających w warunkach szklarniowych, a także w aksenicznych siewkach pszenicy traktowanych wyselekcjonowanymi, na podstawie wyników uzyskanych w Doświadczeniu nr 2, szczepami grzybów, mieszaniną tych grzybów oraz wodą sterylną jako kontrolą.

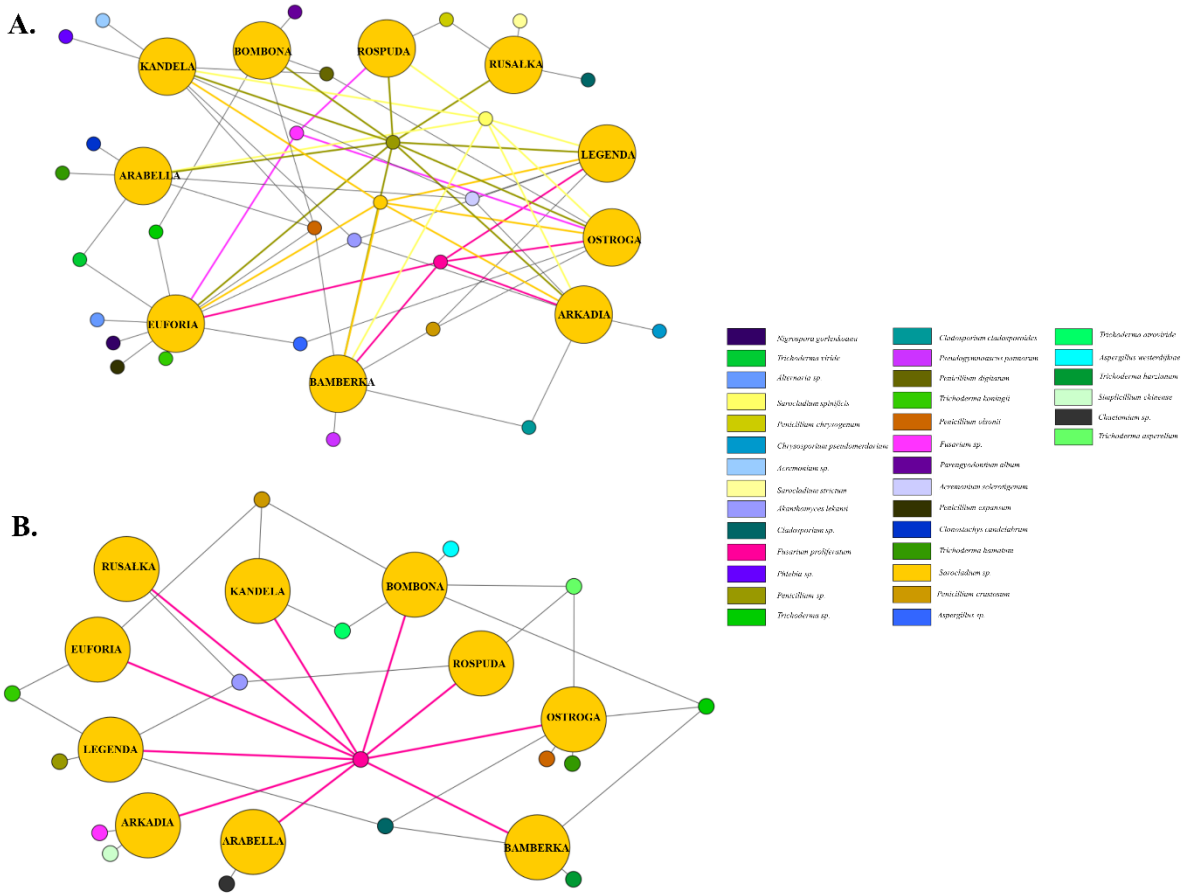
5.3.1 Struktura społeczności grzybów wyizolowanych z endosfery pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) w generacji G1 i G2

Skład mykobiomu generacji G1 i G2 dziesięciu odmian pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) przedstawiono na Rycinie 32.



Rycina 32 A. Mykobiom dziesięciu badanych odmian pszenic w generacji G1 oraz G2, **B** diagram Venn'a przedstawiający liczbowo skład mykobiomu w generacji G1 i G2.

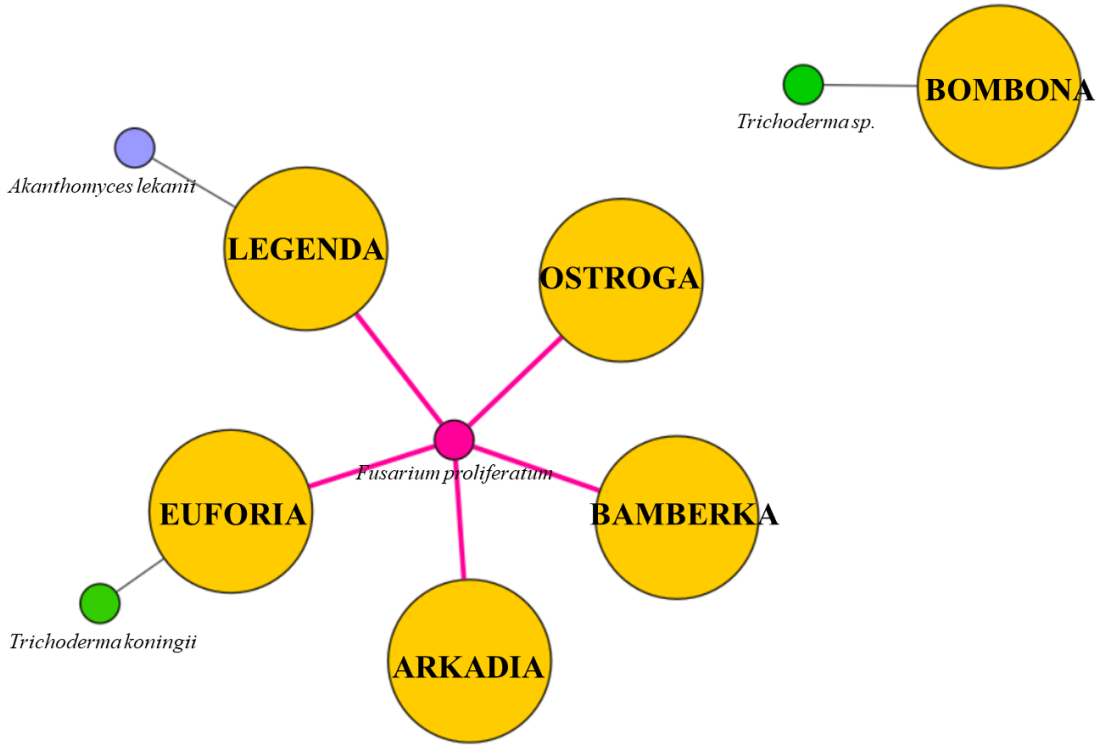
W generacji G1 wyizolowano 225 izolatów, z których 214 zidentyfikowano na podstawie analiz molekularnych i przypisano do 28 rodzajów i gatunków grzybów. w kolejnej generacji – G2 – wyizolowano jedynie 76 izolatów, z których 64 zostały zidentyfikowane do 15 rodzajów/gatunków grzybów. W pokoleniu G1 dominowały gatunki *S. spinificis* i *S. strictum*. Ich występowanie zaobserwowano w każdej badanej odmianie, z wyjątkiem odmiany Bombona (Ryc 33A). Natomiast w pokoleniu G2 dominującym gatunkiem we wszystkich badanych odmianach pszenicy był *F. proliferatum* (Ryc. 33B).



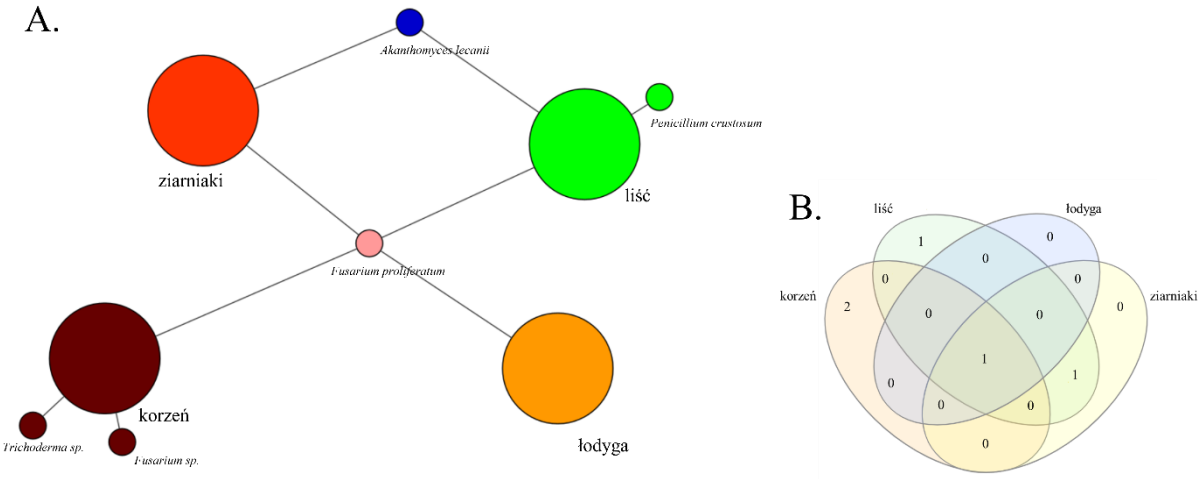
Rycina 33 Sieć wspólnych powiązań rodzajów/gatunków grzybów endofitycznych występujących w badanych odmianach pszenicy w generacji G1 (**A**) i G2 (**B**). Krawędzie zaznaczone kolorem różowym wskazują występowanie grzybów z rodzaju *Fusarium*, a kolorem żółtym grzybów z rodzaju *Sarocladium*.

Tylko 9 gatunków/rodzajów grzybów endofitycznych było wspólnych dla obydwu pokoleń, a były to: *Fusarium sp.*, *F. proliferatum*, T. *koningii*, A. *lecanii*, *Trichoderma sp.*, P. *crustosum*, T. *hamatum*, P. *olsonii*, *Cladosporium sp.* (Ryc. 32A).

Analiza porównawcza składu mykobiomu dwóch generacji roślin pszenicy G1 i G2, przedstawiona na Ryc. 34 wykazała, że *F. proliferatum* występuje we wszystkich odmianach pszenicy ozimej i w obydwu badanych pokoleniach. Oprócz *F. proliferatum* w obydwu generacjach zaobserwowano występowanie *A. lecanii* w odmianie Legenda i *T. koningii* w odmianie Euforia. Natomiast grzyby z rodzaju *Trichoderma* zidentyfikowano w dwóch generacjach jedynie w pszenicy odmiany Bombona.



Rycina 34 Sieć wzajemnych połączeń przedstawiająca analizę porównawczą mykobiomu w badanych odmianach pszenicy w obu generacjach (G1 oraz G2).

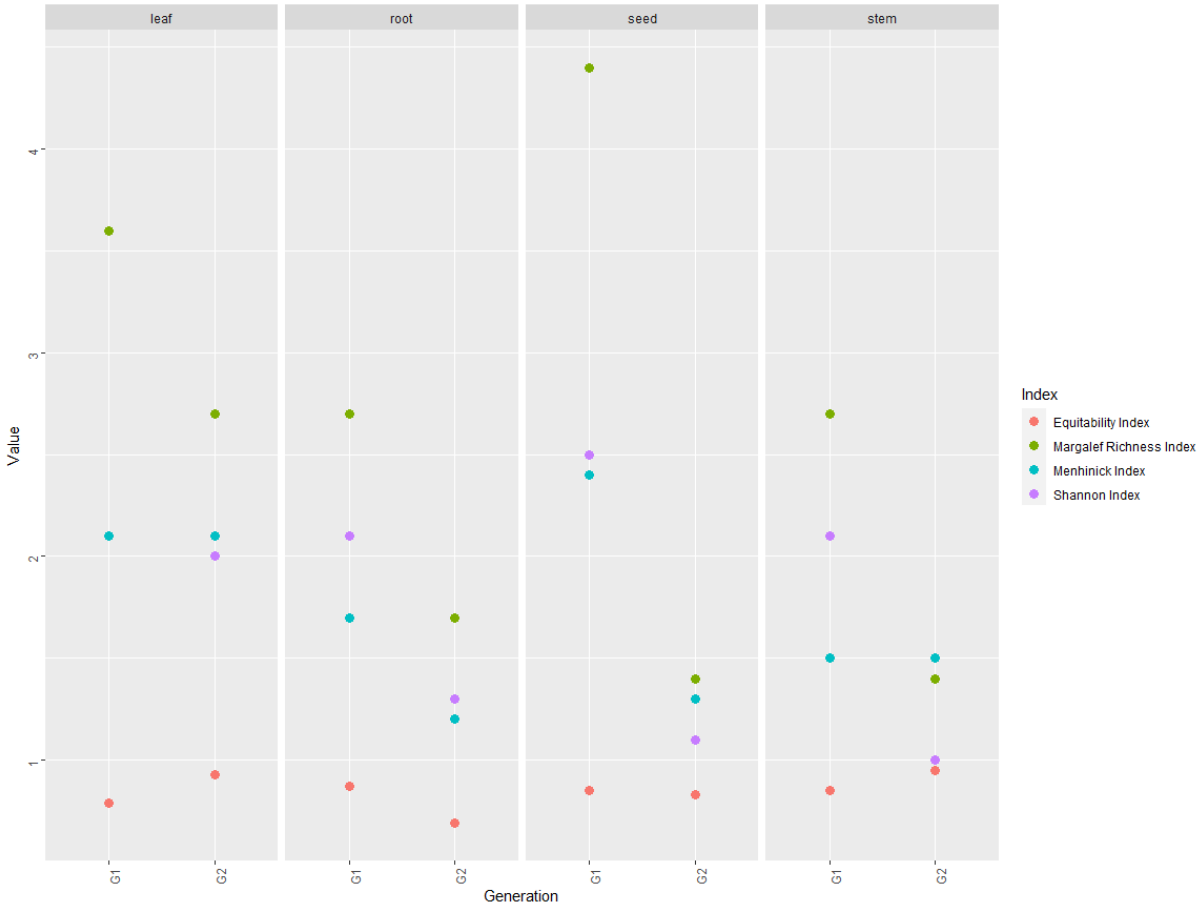


Rycina 35 Sieć wzajemnych połączeń przedstawiająca analizę porównawczą mykobiomu w badanych częściach rośliny w obu generacjach: G1 oraz G2 (A) oraz diagram Venn'a przedstawiający liczbowo daną analizę (B).

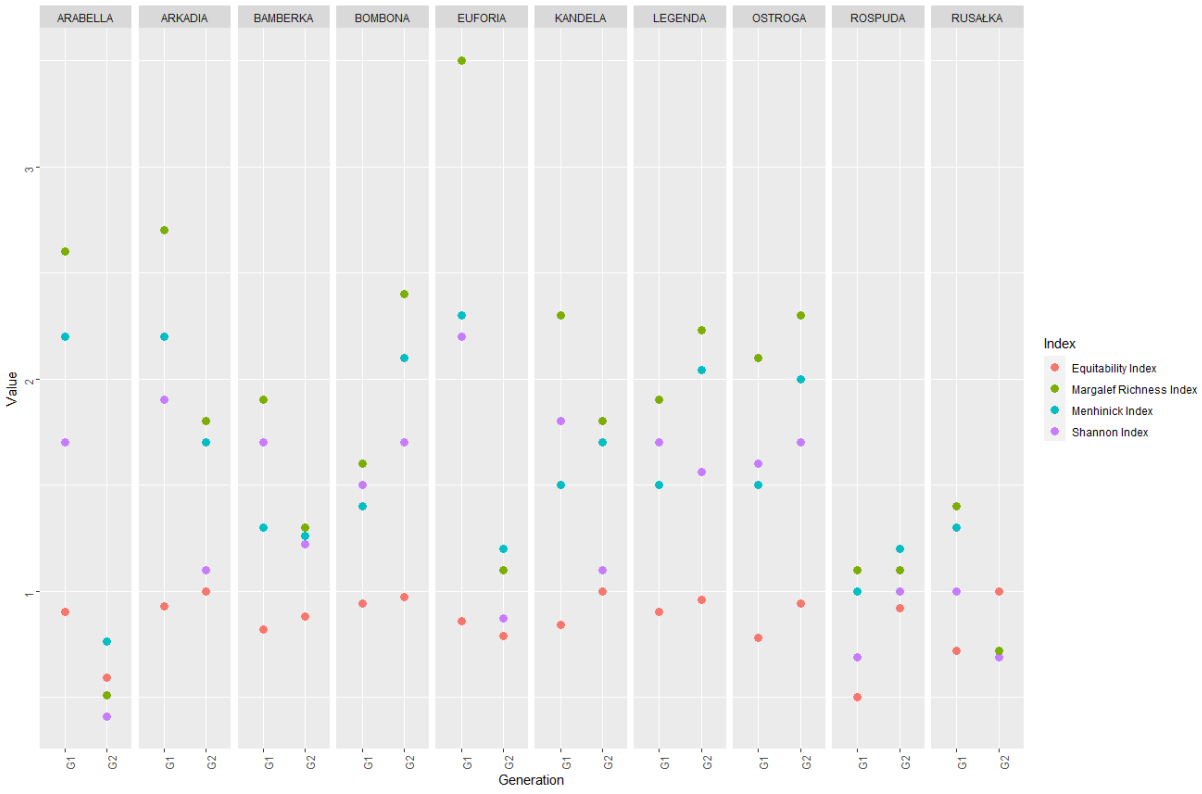
Dodatkowo przeprowadzono porównanie składu mykobiomu w dwóch generacjach roślin z uwzględnieniem organów roślin (korzenie, łodyga, liść i ziarniaki) zaobserwowano obecność *F. proliferatum*. Wykazano, że korzenie wszystkich odmian były zasiedlone przez grzyby z rodzaju *Fusarium* i *Trichoderma*. Natomiast części nadziemne badanych odmian zasiedlały grzyby P. *crustosum* i A. *lecanii* (Ryc. 35).

5.3.2. Wskaźniki bioróżnorodności dla organów roślinnych w generacji G1 i G2

Wskaźniki bioróżnorodności (Indeks Shannona, wskaźnik Margalefa oraz wskaźnik Menhinick'a) i równomierności (Equiatibility Index) wykazały, że największą różnorodnością gatunkową (H = 2,52; MRI=4,4; d=2,4) i stosunkowo dobrym rozmieszczeniem gatunkowym (E = 0,83) w pokoleniu G1 charakteryzowały się ziarniaki, natomiast najniższe wartości różnorodności gatunkowej w pokoleniu G1 zaobserwowano w łodydze (H =2,01; MRI=2,7; d=1,5). Warto zauważyć, że wartości indeksu Shannona w korzeniu i liściach były takie same jak w łodydze (H=2,01) Natomiast w pokoleniu G2 najwyższy wskaźnik bioróżnorodności zaobserwowano w liściach (H = 2,0; MRI=2,7; d=2,1). Wartości wskaźników w pozostałych częściach rośliny były na podobnym poziomie (H = 1,3-1,0; MIR= 1,7-1,4; d= 1,5=1,2). w pokoleniu G2 najwyższą wartość wskaźnika równomierności E zaobserwowano w łodydze (0,95), a najniższą w korzeniu (0,69) [Tab. S1 i Ryc. 36].



Rycina 36 Wskaźniki bioróżnorodności i równomierności w odniesieniu do organów roślin pszenicy w generacji G1 i G2.



Rycina 37 Wskaźniki bioróżnorodności i równomierności w odniesieniu do odmian pszenicy w pokoleniu G1 i G2.

Przeanalizowano również wartości wskaźników bioróżnorodności i równomierności w odniesieniu do odmian pszenicy w pokoleniu G1 i G2 (Tab. S2, Ryc. 37). Wartości wskaźnika bioróżnorodności (H) wahały się od 2,2 do 0,69 w pokoleniu G1. Należy zauważyć, że wyższe wartości zaobserwowano w odmianach pszenicy ozimej. Najwyższym wskaźnikiem spośród wszystkich badanych odmian charakteryzowała się o Euforia (H = 2,2), a najniższym Rospuda (H = 0,69). w pokoleniu G1 stosunkowo dobrym rozmieszczeniem gatunkowym (E) charakteryzowały się odmiany pszenicy ozimej. Wartości wahały się od E = 0,93 w odmianie Arkadia do E = 0,78 w odmianie Ostroga. Natomiast w odmianach pszenicy jarej najmniej jednorodne rozmieszczenie gatunków zaobserwowano w odmianie Rospuda (E = 0,50). Z kolei odmiana Bombona charakteryzowała się dobrym rozmieszczeniem gatunkowym (E = 0,94). Była to najwyższa wartość spośród wszystkich badanych odmian w tym pokoleniu. Przeanalizowano również wskaźnik bogactwa gatunkowego, czyli wskaźnik zróżnicowania Menhinick'a (d). w pokoleniu G1 wartości tego wskaźnika mieściły się w przedziale 2,3 - 1, gdzie najwyższą wartość zaobserwowano w odmianie Euforia, a najniższą w odmianie Rospuda. Potwierdza to także wskaźnik Margalefa, który również w odmianie Euforia przyjmuje wartość najwyższą (MRI = 3,5), a w odmianie Rospuda najniższą (MRI = 1,1).

W pokoleniu G2 wartości wskaźników bioróżnorodności: Indeksu Shannona, Wskaźnika Margalefa oraz Menhinick'a były niższe niż w pokoleniu G1. Wyjątkiem były tu następujące odmiany: Bombona, Rospuda i Ostroga, a także Legenda w przypadku wskaźnika Margalefa i Menhinick'a. Odmiana Bombona charakteryzowała się najwyższą bioróżnorodnością gatunkową (H=1,7; MRI= 2,4; d=2,1). Odmiana Arabella okazała się najuboższa w poszukiwane mikroorganizmy (H=0,41; MRI=0,51; d=0,76). Wartości wskaźnika rozmieszczenia gatunków (E) w pokoleniu G2 były na porównywalnym poziomie. Jedynie w odmianie Arabella zaobserwowano najmniej jednorodne rozmieszczenie gatunków (E = 0,59).

5.3.3. Transmisja pozioma

W Tabeli nr 17 przedstawiono wyniki re-izolacji i re-identyfikacji wyselekcjonowanych szczepów grzybów, którymi traktowano akseniczne siewki pszenicy w celu zbadania zdolności tych gatunków do horyzontalnej transmisji do tkanek roślinnych. Siedem dni po traktowaniu 14-dniowych siewek aksenicznych pszenicy wybranymi endofitami dokonano identyfikacji molekularnej re-izolowanych szczepów grzybów. W tym celu przeprowadzono analizę porównawczą sekwencji nukleotydowych odpowiednich markerów filogenetycznych dla wyizolowanych grzybów z sekwencjami nukleotydowymi uzyskanymi wyjściowo po pierwotnej izolacji badanych endofitów z tkanek pszenicy (Ryc. S3-S6). Analiza porównawcza sekwencji wykazała, że szczepy *F. proliferatum,* P. *olsonii,* P. *expansum* i T. *hamatum* były zdolne do ponownego zasiedlenia tkanek badanych odmian pszenicy. *Fusarium proliferatum* nie wykryto jedynie w odmianach Bombona i Ostroga; P. *expansum* nie wykryto jedynie w odmianie Bamberka, a T. *hamatum* nie zidentyfikowano jedynie w odmianach Bombona, Kandela i Rospuda. *Penicillium olsonii* zasiedlił tkanki wszystkich badanych odmian. w wariantach traktowanych mieszaniną gatunków grzybów endofitycznych P. *expansum* oraz *F. proliferatum* były tymi, które ponownie skolonizowały tkanki roślinne. *Trichoderma hamatum* wyizolowano ponownie z tkanek odmiany Kandela. Natomiast w odmiany Rospuda oprócz P. expansum wyizolowano również P. *olsonii*.

Tabela 17 Identyfikacja szczepów grzybów endofitycznych po inokulacji siewek aksenicznych pszenicy.

	Kontrola	MIX fungi	*F.proliferatum*	*P. olsonii*	*P. expansum*	*T. hamatum*	*E. album*	*S. spinificis*	*C. candelabrum*	*N. gorlenkoana*
ARABELLA	-	*P.e.*	+	+	+	+	-	-	-	-
ARKADIA	-	*P.e.*	+	+	+	+	-	-	-	-
BAMBERKA	-	*P.e.*	+	+	-	+	-	-	-	-
BOMBONA	-	*P.e., F.p.*	-	+	+	-	-	-	-	+
EUFORIA	-	*P.e, F.p.*	+	+	+	+	-	-	-	-
KANDELA	-	*T.h.*	+	+	+	-	-	-	-	-
LEGENDA	-	*P.e.*	+	+	+	+	-	-	-	-
OSTROGA	-	*P.e.*	-	+	+	+	-	-	-	-
ROSPUDA	-	*P.e., P.o.*	+	+	+	-	-	-	-	-
RUSAŁKA	-	*P.e., F.p.*	+	+	+	+	-	-	-	-

P.e. – P. expansum
F.p. – F. proliferatum
T.h. – T. hamatum
P.o. – P. olsonii

\+ fungi was observed
\- fungi was not observed

W przypadku szczepów *E. album*, *S. spinificis*, *C. candelabrum* i *N. gorlenkoana* nie zaobserwowano obecności tych grzybów w tkankach żadnej z badanych odmian pszenicy z wyjątkiem odmiany Bombona, w której wykryto szczep *N. gorlenkoana*.

5.4. Doświadczenie nr 4

Doświadczenie nr 4 miało na celu analizę ekspresji wybranych genów pszenicy po 7 dniach od traktowania roślin zawiesiną *F. proliferatum, P. olsonii, P. expansum, T. hamatum* oraz mieszaniną tych grzybów.

5.4.1 Optymalizacja reakcji PCR – wybór starterów

Reakcje PCR dla wytypowanych par starterów (Tab. 12 – Roz. metodyka) przeprowadzono w gradiencie temperatur 55°C – 62°C, w celu znalezienia optymalnej temperatury przyłączania starterów i uzyskania specyficznych produktów reakcji PCR. w Tab. S1 przedstawiono listę wszystkich starterów wytypowanych do analizy ekspresji badanych genów pszenicy, natomiast w Tab. 18 zamieszczono listę starterów wraz ze zoptymalizowaną temperaturą ich przyłączania, które wykorzystano w dalszych etapach doświadczenia.

Tabela 18 Startery wytypowane do reakcji real-time PCR.

Nazwa startera	Temperatura przyłączania starterów
GAPDH-F	61 °C
GAPDH-R	
18S-R	60 °C
18S-F	
RLI-F	60 °C
RLI-R	
Ta2291-F	60 °C
Ta2291-R	
SAR-F	60 °C
SAR-F	

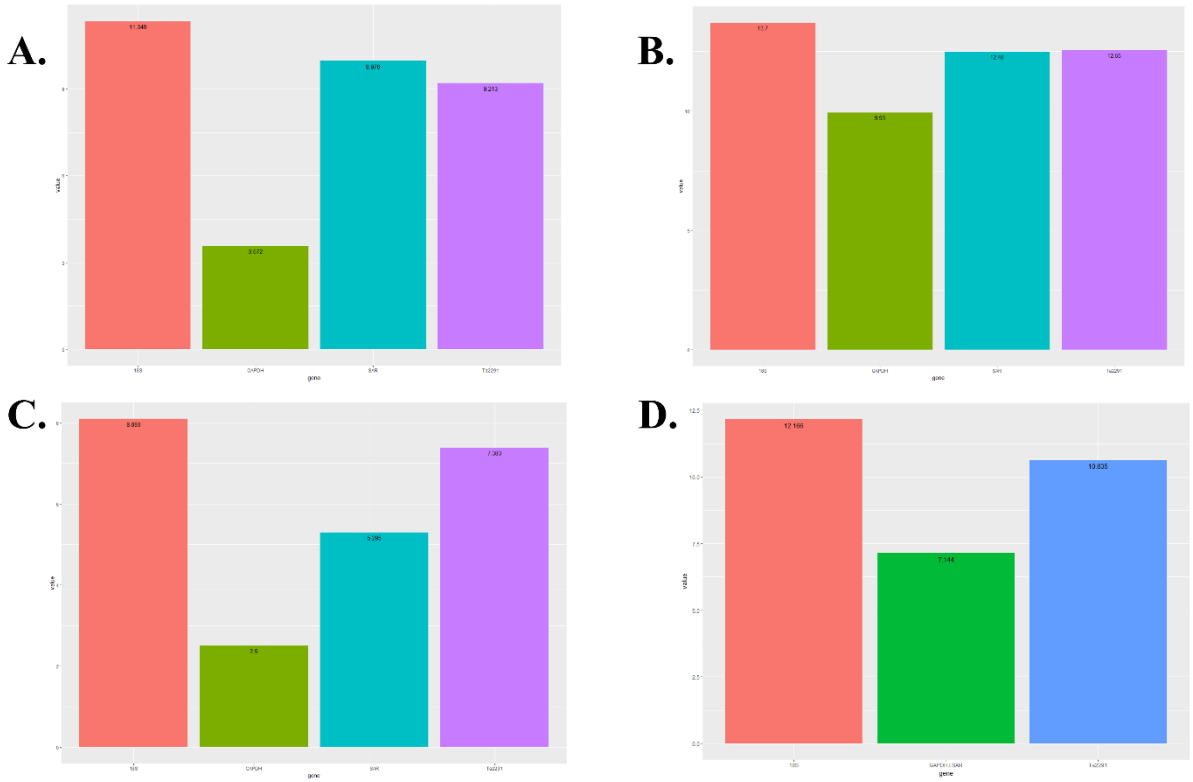
5.4.2 Optymalizacja reakcji real-time PCR dla genów referencyjnych

W celu optymalizacji reakcji real-time PCR i oceny specyficzności wybranych par starterów opracowano krzywe topnienia, stosując seryjne rozcieńczenia od 10^{-1} do 10^{-8} puli cDNA dla każdego układu doświadczalnego: siewki akseniczne kontrolne (traktowane wodą), siewki akseniczne *P. expansum,* siewki akseniczne *P. olsonii,* siewki akseniczne *F. proliferatum,* siewki akseniczne *traktowane T. hamatum*. Przy opracowywaniu krzywych topnienia kierowano się wartościami parametru R^2 i współczynnika efektywności. Dla czterech par starterów, oprócz pary RLI-F/R uzyskano prawidłowe krzywe topnienia (Ryc. S1-S5).

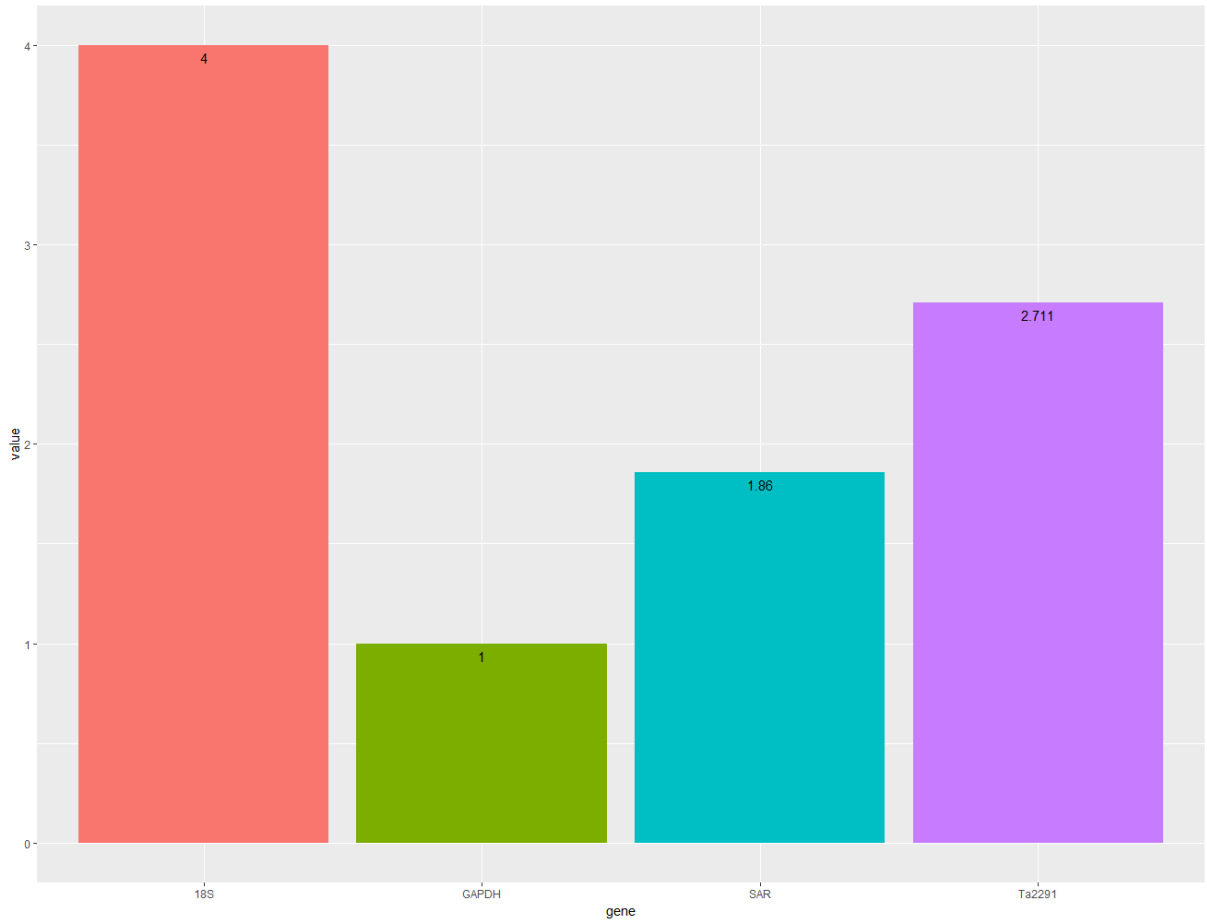
w próbkach bez matrycy nie zaobserwowano żadnych dimerów starterów i produktów PCR. Ponadto wartości Ct uzyskane dla poszczególnych powtórzeń biologicznych danego układu doświadczalnego i dla każdej pary starterów (z wyjątkiem RLI-F/R) mieściły się w liniowym zakresie krzywych topnienia.

5.4.3 Wybór genów referencyjnych

Stabilność genów badano przy użyciu czterech różnych algorytmów: geNorm, NormFinder i BestKeeper oraz porównawczej metody delta-Ct. Wykonano analizy dla każdego układu doświadczalnego - traktowania niezależnie. Nie wykazano jednak istotnych różnic między traktowaniami, sugerującymi wybór innego genu referencyjnego jak do pozostałych. Na Ryc. 38 pokazano wyniki analiz przeprowadzonych dla wszystkich układów doświadczalnych. Odnotowano, że najbardziej stabilnym genem jest GAPDH, natomiast analiza Genorm wskazała, że najbardziej stabilną parą genów jest GAPDH oraz SAR. Potwierdziła to też analiza porównawcza, biorąca pod uwagę wyniki wszystkich wykorzystanych algorytmów (Ryc. 39).



Rycina 38 Kombinacja genów referencyjnych odpowiednich do normalizacji, zdefiniowana przez normFinder (A), deltaCT (B) BestKeeper (C) oraz Genorm(D). Kolorem zielonym na wykresie zaznaczono najbardziej stabilny gen.



Rycina 39 Kombinacja genów referencyjnych odpowiednich do normalizacji. Kolorem zielonym na wykresie zaznaczono najbardziej stabilny gen.

5.4.4 Optymalizacja reakcji PCR dla markerów stresu

W Tab. S1 przedstawiono pary starterów dla markerów stresu, które poddano optymalizacji. Reakcje PCR prowadzono w gradiencie temperaturowym 55-62ºC. Na podstawie reakcji PCR oraz rozdziałów elektroforetycznych wytypowano do dalszych analiz startery, które przedstawiono w Tab. 19.

Tabela 19 Startery wytypowane do reakcji real-time PCR.

Nazwa startera	Temperatura przyłączania starterów
SOD-F	60 ºC
SOD-R	
TA-JA2-F	62 ºC
TA-JA2-R	
Ta-GLP2a-F	62 ºC
Ta-GLP2a-R	

Ta-PERO-PR9-F	58 °C
Ta-PERO-PR9-R	
HSP70-F	60 °C
HSP70-R	
CHI3f	58 °C
CHI3r	
Wheatwin1-2-PR4-f	55 °C
Wheatwin1-2-PR4-r	
TaABA8OH1F	60 °C
TaABA8OH1	
WAS3a-PR5-f	56 °C
WAS3a-PR5-r	

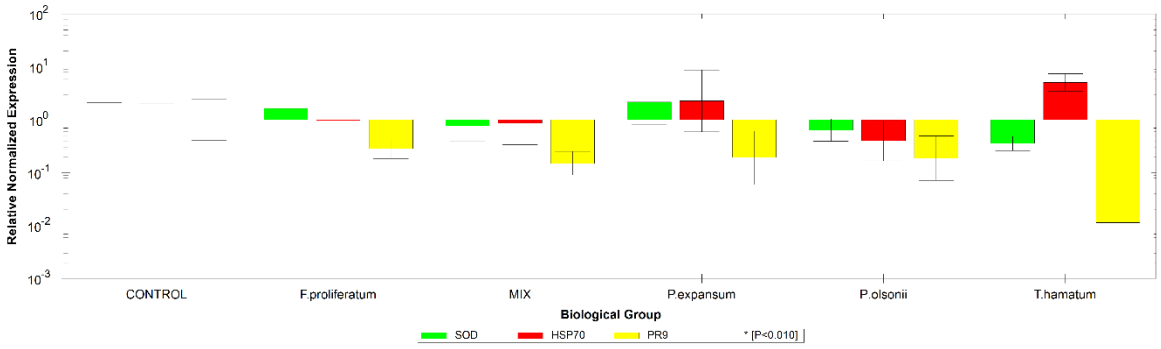
5.4.5 Optymalizacja reakcji real-time PCR dla wybranych markerów stresu

W wyniku analiz real-time PCR wyznaczono liniowy zakres dynamicznego Cq dla każdej pary starterów stosując seryjne rozcieńczenia od 10^{-1} do 10^{-8} puli cDNA dla każdego traktowania. Genami ulegającymi ekspresji w pięciu traktowaniach były *HSP70*, *PR9* oraz *SOD*. Wydajności qPCR nie różniły się istotnie między genami i były bliskie 100% przy akceptowalnych wartościach R^2. Swoistość qPCR zweryfikowano za pomocą analizy krzywej topnienia. w próbkach bez matrycy nie zaobserwowano żadnych dimerów starterów. Ostatecznie ekspresja wszystkich tych genów w próbkach mieściła się w liniowym zakresie dynamicznym. Pozostałe geny zostały wyeliminowane z dalszych analiz.

5.4.6 Analiza zmiany ekspresji wybranych markerów stresu

Ryciny 40-50 przedstawiają wykresy obrazujące zmiany w ekspresji genów kodujących peroksydazę (*PR9*) oraz dysmutazę ponadtlenkową (*SOD*) w roślinach pszenicy jarej i ozimej po 7 dniach od traktowania grzybami *F. proliferatum, P. olsonii, P.expansum, T. hamatum* oraz mieszaniną tych grzybów. Jako referencyjny zastosowano gen kodujący dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (*GAPDH*) oraz gen kodujący SAR (ang. *Scaffold-associated region DNA binding protein*). Obliczenia wykonywano z użyciem program CFX Maestro qPCR (BioRad, California, USA).Wykresy przedstawiono w skali logarytmicznej.

5.4.6.1 Zmiany ekspresji genów zachodzące w pszenicy

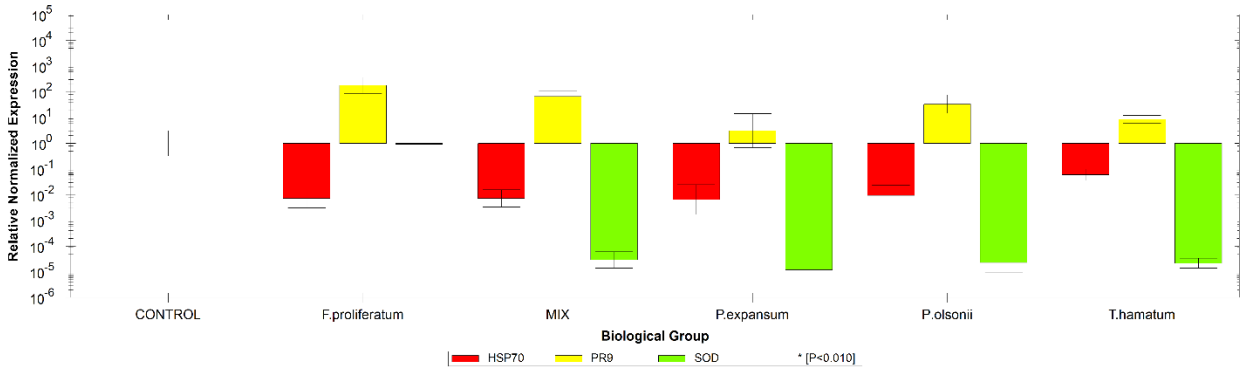


Rycina 40 Porównanie poziomu ekspresji genów *HSP70* (kolor czerwony), *PR9* (kolor żółty) oraz *SOD* (kolor zielony) w siewkach badanych odmian pszenicy po 7 dniach od inokulacji *F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T. hamatum* oraz mieszaniną tych grzybów (MIX).

Analiza real-time PCR wykazała spadek poziomu ekspresji genu *PR9* w roślinach pszenicy zwyczajnej niezależnie od traktowania. Zaobserwowano natomiast, że gen *HSP70* ulega nadekspresji w roślinach traktowanych T. *hamatum i P. expansum,* a po traktowaniu P. *olsonii* jego ekspresja spada poniżej poziomu wykrytego u roślin kontrolnych. Nadekspresję genu *SOD* odnotowano w roślinach traktowanych *F. proliferatum* oraz P. *expansum*. Natomiast traktowanie P. *olsonii* oraz T. *hamatum* wpłynęło na obniżenie poziomu ekspresji tego genu.

5.4.6.2 Zmiany ekspresji genów zachodzące w 21-dniowych siewkach pszenicy jarej odmiany Arabella

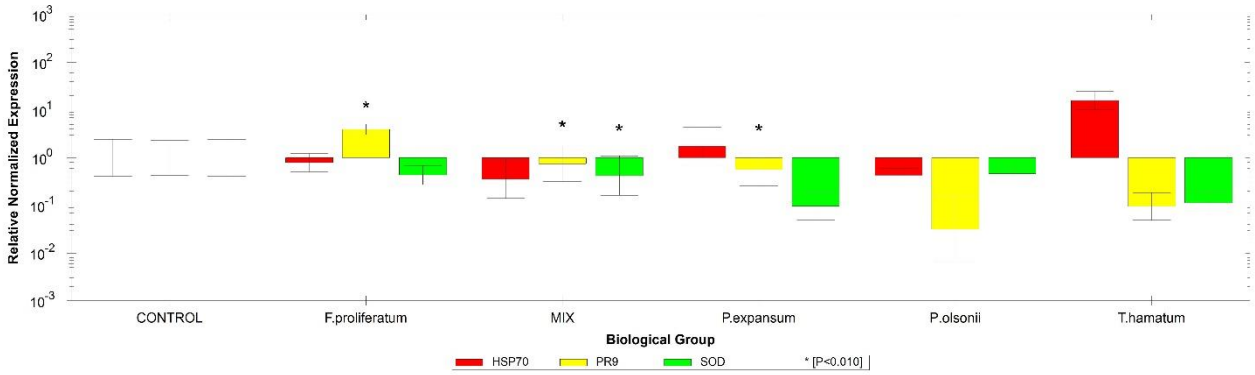
W przypadku odmiany Arabella analiza ekspresji genów wykazała, że w 21-dniowych siewkach gen *PR9* ulega nadekspresji u roślin traktowanych poszczególnymi gatunkami grzybów oraz ich mieszaniną. w siewkach tej odmiany zaobserwowano natomiast znaczny spadek ekspresji genu *HSP70* we wszystkich układach doświadczalnych. Podobnie jak w przypadku genu HSP70, zaobserwowano spadek ekspresji genu *SOD* po traktowaniu mieszaniną grzybów, a także po traktowaniu grzybami z rodzaju *Penicillium* oraz *Trichoderma hamatum*. Jedynie po traktowaniu siewek *F. profileratum* zauważono niewielki wzrost ekspresji tego genu. Dla wszystkich badanych genów nie wykazano jednak różnic istotnych statystycznie pomiędzy traktowaniami (Ryc. 41).



Rycina 41 Porównanie ekspresji genów *HSP70* (kolor czerwony), *PR9* (kolor żółty) oraz *SOD* (kolor zielony) w siewkach pszenicy odmiany **Arabella** po 7 dniach od inokulacji *F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T.hamatum* oraz mieszaniną tych grzybów (MIX).

5.4.6.3 Zmiany ekspresji genów zachodzące w 21-dniowych siewkach pszenicy ozimej odmiany Arkadia

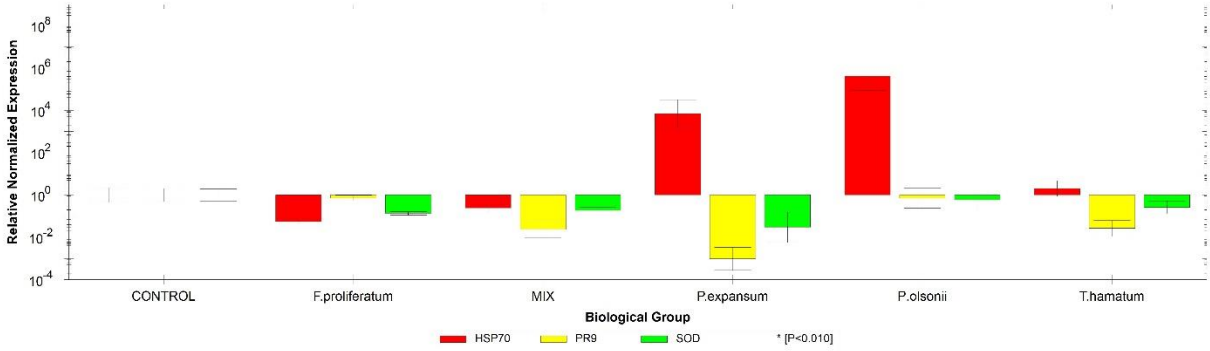
W przypadku odmiany Arkadia analiza ekspresji genów wykazała, że w 21-dniowych siewkach gen *PR9* ulega nadekspresji u roślin traktowanych grzybami *F. proliferatum*. Wykazano wysoce istotne różnice statystyczne ($p<0,1$) pomiędzy kontrolą a roślinami traktowanymi tym gatunkiem. w przypadku pozostałych traktowań zaobserwowano spadek ekspresji tego genu. Wykazano istotne statystycznie różnice pomiędzy kontrolą a roślinami traktowanymi P. *expansum* oraz mieszaniną grzybów na poziomie istotności $p<0,1$. w siewkach odmiany Arkadia traktowanych *F. proliferatum, P. olsonii* oraz mieszaniną grzybów zaobserwowano spadek ekspresji genu *HSP70*, natomiast w siewkach traktowanych P. *expansum* oraz T. *hamatum* odnotowano wzrost ekspresji tego genu. Nie wykazano jednak różnic istotnych statystycznie pomiędzy kontrolą a roślinami inokulowanymi grzybami. u odmiany Arkadia wykazano spadek ekspresji genu *SOD* po traktowaniach pojedynczymi gatunkami grzybów jak i ich mieszaniną. Jednakże, tylko po traktowaniu siewek mieszaniną tych grzybów zauważono różnice istotne statystycznie (przy $p<0,1$) w stosunku do kontroli (Ryc. 42).



Rycina 42 Porównanie ekspresji genów HSP70 (kolor czerwony), PR9 (kolor żółty) oraz SOD (kolor zielony) w siewkach pszenicy odmiany Arkadia po 7 dniach od inokulacji F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T.hamatum oraz mieszaniną tych grzybów (MIX).

5.4.6.4 Zmiany ekspresji genów zachodzące w 21-dniowych siewkach pszenicy ozimej odmiany Bamberka

Analiza ekspresji genów u odmiany Bamberka wykazała, że w 21-dniowych siewkach następował spadek ekspresji genu *PR9* w roślinach traktowanych grzybami oraz ich mieszaniną. Wzrost ekspresji genu *HSP70* w roślinach tej odmiany wykazano po jej traktowaniu grzybami z rodzaju *Penicillium*: P. *expansum* oraz P. *olsonii*. Natomiast gen *SOD* ulegał obniżonej ekspresji u roślin traktowanych zarówno pojedynczymi szczepami jak i ich mieszaniną (Ryc. 43). Nie wykazano jednak różnic istotnych statystycznie pomiędzy roślinami kontrolnymi a traktowanymi szczepami grzybów.

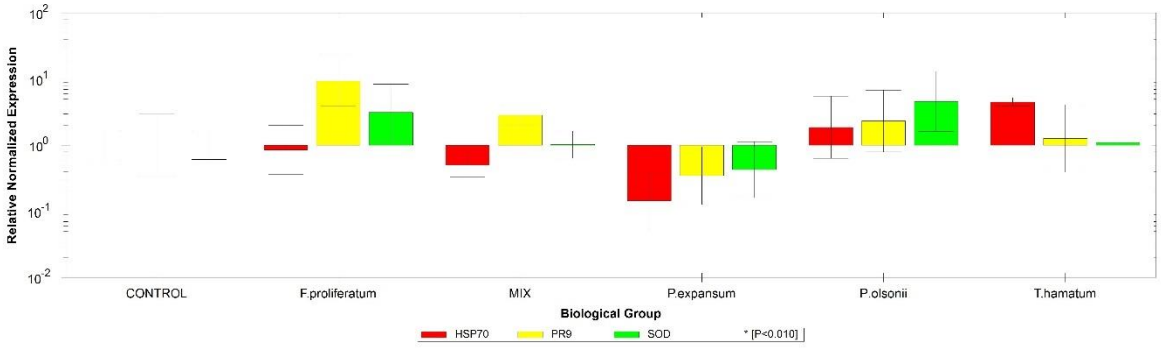


Rycina 43 Porównanie ekspresji genów HSP70 (kolor czerwony), PR9(kolor żółty) oraz SOD (kolor zielony) w siewkach pszenicy odmiany Bamberka po 7 dniach od inokulacji F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T.hamatum oraz mieszaniną tych grzybów (MIX).

5.4.6.5 Zmiany ekspresji genów zachodzące w 21-dniowych siewkach pszenicy jarej odmiany Bombona

Analiza ekspresji genów przeprowadzona w odniesieniu do roślin odmiany Bombona wykazała spadek ekspresji genu *PR9* w 21-dniowych siewkach pszenicy traktowanych

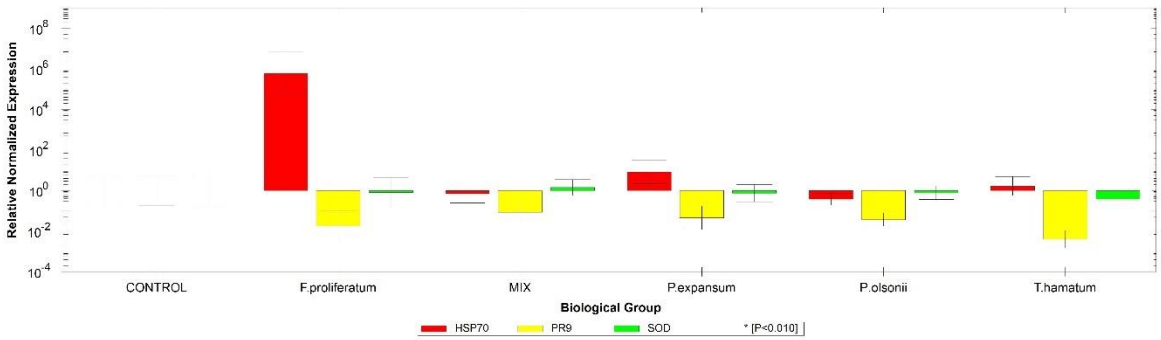
grzybami P. *expansum*. Traktowanie roślin pozostałymi gatunkami grzybów wpłynęło na podniesienie poziomu ekspresji tego genu w roślinach. w siewkach odmiany Bombona zaobserwowano spadek ekspresji genu *HSP70* po traktowaniu grzybami P. *expansum*, *F. proliferatum* oraz mieszaniną wszystkich grzybów. w pozostałych próbach (rośliny traktowane *T. hamatum* oraz P. *olsonii*) zaobserwowano wzrost ekspresji tego genu. Natomiast ekspresja genu *SOD* w siewkach pszenicy inokulowanych P. *expansum* uległa obniżeniu w porównaniu do roślin kontrolnych, a u roślin inokulowanych *F. proliferatum* oraz P. *olsonii* zaobserwowano wzrost ekspresji tego genu. Nie wykazano jednak różnic istotnych statystycznie (Ryc. 44).



Rycina 44 Porównanie ekspresji genów *HSP70* (kolor czerwony), *PR9* (kolor żółty) oraz *SOD* (kolor zielony) w siewkach pszenicy odmiany **Bombona** po 7 dniach od inokulacji *F. proliferatum*, *P. expansum*, *P. olsonii*, *T.hamatum* oraz mieszaniną tych grzybów (MIX).

5.4.6.6 Zmiany ekspresji genów zachodzące w 21-dniowych siewkach pszenicy ozimej odmiany Euforia

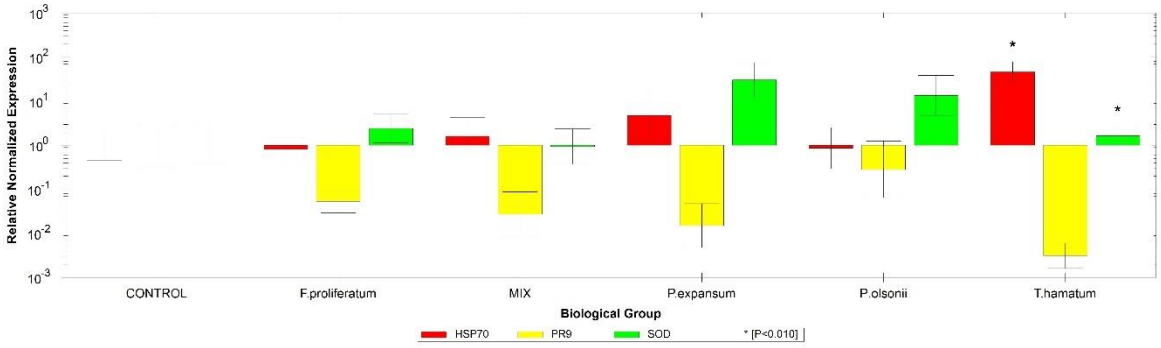
W 21-dniowych siewkach odmiany Euforia traktowanych zarówno pojedynczymi gatunkami grzybów jak i ich mieszaniną odnotowano spadek ekspresji genu *PR9*. w siewkach tej odmiany zaobserwowano nieznaczny spadek ekspresji genu *HSP70* po traktowaniu P. *olsonii* oraz mieszaniną grzybów. w roślinach traktowanych T. *hamatum*, P. *expansum* oraz *F. proliferatum* zaobserwowano natomiast wzrost ekspresji tego genu. w przypadku ekspresji genu *SOD* w siewkach pszenicy zaobserwowano jego niewielki spadek po traktowaniu grzybami T. *hamatum*. Nie wykazano jednak różnic istotnych statystycznie (Ryc. 45).



Rycina 45 Porównanie ekspresji genów HSP70 (kolor czerwony), PR9 (kolor żółty) oraz SOD (kolor zielony) w siewkach pszenicy odmiany Euforia po 7 dniach od inokulacji F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T.hamatum oraz mieszaniną tych grzybów (MIX).

5.4.6.7 Zmiany ekspresji genów zachodzące w 21-dniowych siewkach pszenicy jarej odmiany Kandela

W przypadku odmiany Kandela analiza ekspresji genów wykazała spadek ekspresji genu *PR9* w 21-dniowych siewkach poddanych inokulacji grzybami endofitycznymi. Natomiast w roślinach traktowanych grzybami *F. proliferatum, P. olsonii, P. expansum, T. hamatum* oraz mieszaniną wszystkich gatunków zaobserwowano wzrost ekspresji genu *HSP70*. w przypadku traktowania roślin T. *hamatum* różnice te odnotowano jako istotne statystycznie ($p<0,1$). Podobnie w roślinach traktowanych T. *hamatum* odnotowano istotnie ($p<0,1$) wyższy poziom ekspresji genu *SOD* niż w roślinach kontrolnych (Ryc. 46).

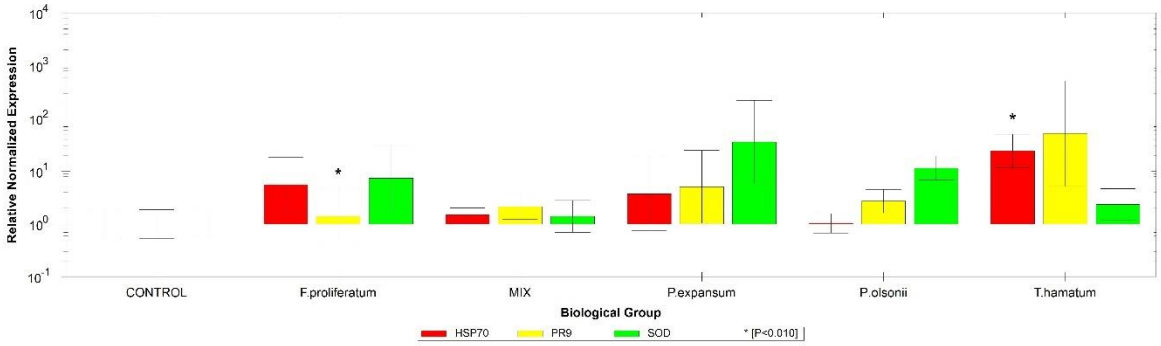


Rycina 46 Porównanie ekspresji genów HSP70 (kolor czerwony), PR9(kolor żółty) oraz SOD (kolor zielony) w siewkach pszenicy odmiany Kandela po 7 dniach od inokulacji F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T .hamatum oraz mieszaniną tych grzybów (MIX).

5.4.6.8 Zmiany ekspresji genów zachodzące w 21-dniowych siewkach pszenicy ozimej odmiany Legenda

W 21-dniowych siewkach odmiany Legenda traktowanych grzybami analiza real-time PCR wykazała wzrost ekspresji genu *PR9*. w przypadku traktowania siewek grzybami *F. proliferatum*, zaobserwowano różnice istotne statystycznie (na poziomie istotności $p<0,1$) pomiędzy kontrolą a roślinami traktowanymi. Podobnie, w roślinach traktowanych grzybami

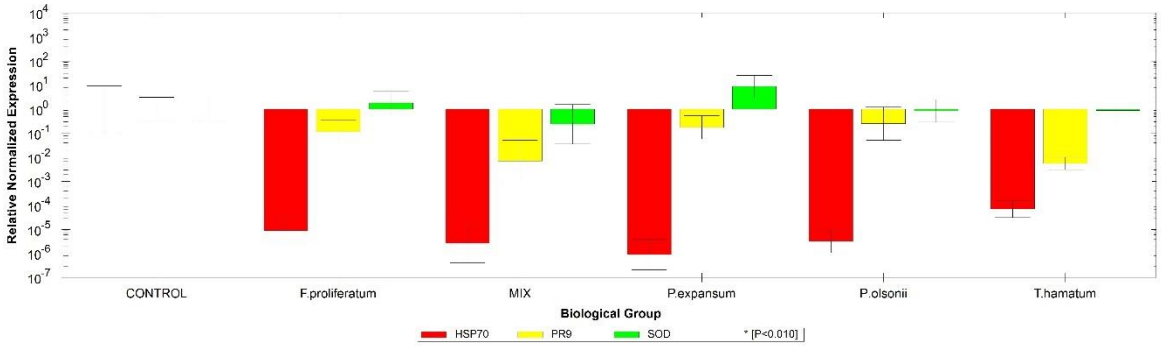
zaobserwowano wzrost ekspresji genu *HSP70* . w przypadku traktowania siewek T. *hamatum* różnice pomiędzy kontrolą a traktowaniem uznano jako istotne statystycznie na poziomie istotności p<0,1. w siewkach odmiany Legenda traktowanych grzybami zaobserwowano również wzrost ekspresji genu SOD. Różnice te pomiędzy kontrolą a roślinami traktowaniami grzybami nie były jednak istotne statystycznie (Ryc. 47).



Rycina 47 Porównanie ekspresji genów HSP70 (kolor czerwony), PR9 (kolor żółty) oraz SOD (kolor zielony) w siewkach pszenicy odmiany Legenda po 7 dniach od inokulacji F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T.hamatum oraz mieszaniną tych grzybów (MIX).

5.4.6.9 Zmiany ekspresji genów zachodzące w 21-dniowych siewkach pszenicy ozimej odmiany Ostroga

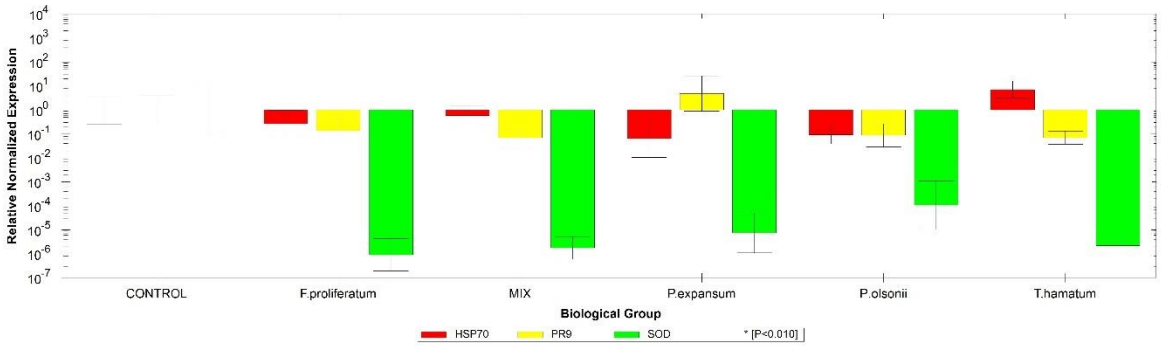
Analiza real-time PCR przeprowadzona dla roślin odmiany Ostroga wykazała spadek ekspresji genu *PR9* i *HSP70* we wszystkich próbach roślin traktowanych grzybami. w przypadku ekspresji genu *SOD* zaobserwowano jej niewielki spadek w siewkach pszenicy po traktowaniu mieszaniną grzybów oraz wzrost ekspresji po traktowaniu grzybami P. *expansum* oraz *F. proliferatum*. Nie wykazano jednak różnic istotnych statystycznie (Ryc. 48).



Rycina 48 Porównanie ekspresji genów HSP70 (kolor czerwony), PR9 (kolor żółty) oraz SOD (kolor zielony) w siewkach pszenicy odmiany Ostroga po 7 dniach od inokulacji F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T.hamatum oraz mieszaniną tych grzybów (MIX).

5.4.6.10 Zmiany ekspresji genów zachodzące w 21-dniowych siewkach pszenicy jarej odmiany Rospuda

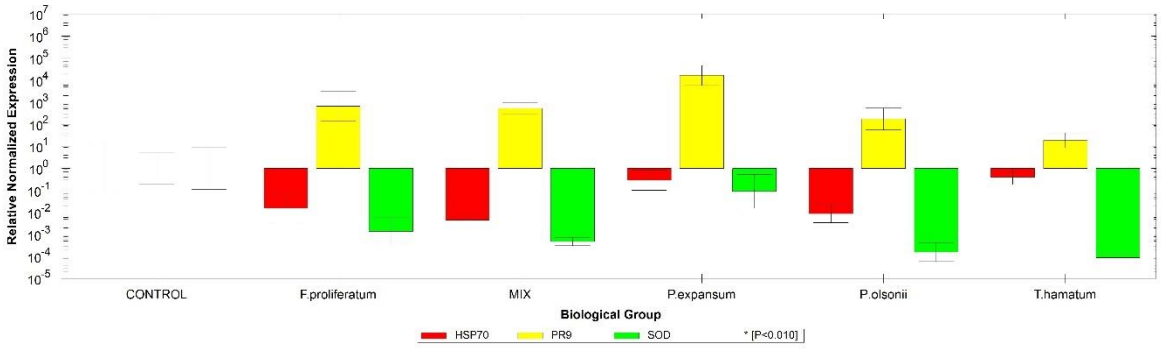
U odmiany Rospuda zaobserwowano wzrost ekspresji genu *PR9* jedynie w roślinach traktowanych P. *expansum* oraz wzrost ekspresji genu *HSP70* wyłącznie w roślinach traktowanych T. *hamatum*. w roślinach traktowanych grzybami zaobserwowano natomiast obniżony poziom ekspresji genu *SOD*. Różnice te nie wykazano jednak jako istotne statystycznie (Ryc. 49).



Rycina 49 Porównanie ekspresji genów HSP70 (kolor czerwony), PR9 (kolor żółty) oraz SOD (kolor zielony) w siewkach pszenicy odmiany **Rospuda** po 7 dniach od inokulacji F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T.hamatum oraz mieszaniną tych grzybów (MIX).

5.4.6.11 Zmiany ekspresji genów zachodzące w 21-dniowych siewkach pszenicy jarej odmiany Rusałka

W roślinach pszenicy odmiany Rusałka traktowanych grzybami zaobserwowano spadek ekspresji genu *HSP70* oraz *SOD* przy wzroście ekspresji genu *PR9*. Różnice pomiędzy roślinami kontrolnymi a tymi traktowanymi zarodnikami grzybów nie uznano jednak jako istotne statystycznie (Ryc. 50).



Rycina 50 Porównanie ekspresji genów HSP70 (kolor czerwony), PR9 (kolor żółty) oraz SOD (kolor zielony) w siewkach pszenicy odmiany **Rusałka** po 14 dniach od inokulacji F. proliferatum, P. expansum, P. olsonii, T.hamatum oraz mieszaniną tych grzybów (MIX).

VI Dyskusja

W rozprawie doktorskiej analizowano skład gatunkowy społeczności grzybów zasocjowanych z wewnętrznymi tkankami pszenicy. Strukturę mykobiomu endosfery analizowano w pięciu polskich odmianach pszenicy formy jarej i pięciu odmianach formy ozimej. Skład gatunkowy określano w głównych organach roślinnych, a mianowicie w korzeniach, liściach, łodydze i ziarniakach w fazie dojrzałości mlecznej. Ponadto badano wpływ warunków uprawy pszenicy na występowanie grzybów endofitycznych. W pracy zastosowano klasyczne podejście do analizy mykobiomu endosfery, oparte na izolacji grzybów z tkanek i ich hodowli na podłożach laboratoryjnych. Podejście to umożliwiło uzyskanie jednorodnych izolatów grzybów, które skolekcjonowano i wykorzystano w dalszych badaniach. Wszystkie uzyskane izolaty grzybów poddano identyfikacji gatunkowej.

Identyfikacja gatunkowa grzybów endofitycznych na podstawie obserwacji morfologicznych i wzrostu grzybni na podłożu laboratoryjnym jest niezwykle trudna i wymaga dużego doświadczenia [Raja i in., 2017]. Dlatego też w niniejszej pracy skoncentrowano się na metodach molekularnych opartych na analizie sekwencji wybranych fragmentów DNA jednorodnych kultur grzybów, wyizolowanych z tkanek wewnętrznych roślin. Najczęściej używanym regionem do różnicowania grzybów na poziomie rodzaju i gatunku jest region ITS1 i ITS2 rDNA [Kuzdraliński i in., 2017; Nilsson i in., 2014]. Region ITS jako marker molekularny wykorzystano do identyfikacji wielu ważnych dla rolnictwa grzybów, takich jak *Colletotrichum sp., Fusarium sp., Alternaria sp., Puccinia sp., Rhizoctonia sp.* [Nilsson i in., 2014]. Zastosowanie regionu ITS jako markera filogenetycznego ma wiele zalet, takich jak udana amplifikacja wśród wszystkich rodzajów grzybów przy użyciu uniwersalnych starterów, odpowiednie dla sekwencjonowania długości fragmentów, oraz dostępne bazy danych molekularnych (NCBI, UNITE i EzTaxon). Pomimo zalet, region ITS nie jest odpowiedni dla wszystkich gatunków grzybów jako marker filogenetyczny klasyfikujący do poziomu gatunku. Istnieją bowiem różne odległości międzygatunkowe i wewnątrzgatunkowe [Sun i in., 2011], a określenie progu rozbieżności sekwencji ITS w celu rozróżnienia gatunków grzybów jest wówczas trudne [Glass i Donaldson, 1995]. Wykazano natomiast, że duża podjednostka (LSU, 28S) rRNA ma lepszą rozdzielczość selekcyjną niż ITS, ponieważ gen 28S dla niektórych taksonów grzybów jest bardziej zmienny i używany na poziomie rodzajów i gatunków [Vu i in., 2019]. Ponadto do identyfikacji grzybów zalecane jest wykorzystanie fragmentów genów kodujących uniwersalne białka: β-tubulinę, elongacyjny czynnik translacji 1α, polimerazę RNA

II, syntazę ATP, γ-aktynę, kalmodulinę [Lutzoni i in., 2004; Carbone i Kohn, 1999; Hong i in., 2005; Maciá-Vicente i in., 2008; Brun i in., 2013]. W badaniach nad endofitami pszenicy region ITS był najczęściej używanym markerem w identyfikacji molekularnej, wykazując pewien potencjał w badaniach różnorodności lub w poszukiwaniu szczepów endofitycznych korzystnych dla pszenicy, pomimo istniejących ograniczeń w rozróżnianiu gatunków [Gdanetz i Trail, 2017]. Ten region DNA był używany przez Larrana i in. [2007] do identyfikacji grzybów endofitycznych wyizolowanych z liści pszenicy, łodyg, plew i ziaren; przez Comby'ego i in. [2016] do klasyfikacji endofitów z korzeni i organów nadziemnych, w tym liści, łodyg, pylników, plew; oraz przez Bouzouina i in. [2021] w celu określenia gatunków grzybów endofitycznych wyizolowanych z korzeni pszenicy. Natomiast zestaw kilku markerów molekularnych został wykorzystany przez Llorens i in. [2019] w celu prawidłowej klasyfikacji 2 izolatów *Acremonium sp.* z *Aegilops sharonensis*; przez Salamon i in. [2020] w celu identyfikacji 54 izolatów z endosfery korzeni pszenicy zwyczajnej i pszenicy orkisz oraz przez Rojas i in. [2020] w celu określenia gatunku dla 163 izolatów grzybów pozyskanych z kłosów pszenicy. W niniejszej pracy, w celu prawidłowego zaklasyfikowania wyizolowanych grzybów do gatunku, oprócz analizy regionu ITS, wykorzystano dodatkowo dużą podjednostkę (LSU) nRNA [Vilgalys i in., 1990] oraz małą podjednostkę (SSU) nRNA [White i in., 1990], a także fragment genu kodującego elongacyjny czynnik translacyjny 1-α (*tef1*) [Roger i in., 1999], fragment genu kodującego β-tubulinę (*tub2*) [Edlind i in., 1996], fragment genu kodującego aktynę (*act*) [Drouin i in., 1995] i fragment genu kodującego kalmodulinę (*cmd*) [Hong i in., 2005].

6.1. Skład gatunkowy grzybów zasiedlających endosferę pszenicy zwyczajnej

W niniejszej pracy, w tkankach wewnętrznych polskich odmian pszenicy zwyczajnej zaobserwowano występowanie dużego bogactwa grzybów z gatunkami dominującymi oraz rzadkimi. W endosferze pszenicy wzrastającej w warunkach kontrolowanych (generacja G1 i G2) i polowych zidentyfikowano 85 następujących rodzajów/gatunków grzybów: *Acremonium sp.* (*A. sclerotigenum*), *A. betulicola, A. lecanii, Alternaria sp. (A. alternata, A. conjuncta, A. infectoria), Anthracocystis sp. (A. flocculosa), Arthrinium sp., Aspergillus sp. (A. westerdijkiae), A. pullulans, Backusella sp., B. sorokiniana, Cadophora sp., Chaetomium sp. Cladosporium sp. (C. allicinum, C. cladosporoides), C. pseudomerdarium, C. candelabrum, Colletotrichum sp., Didymella sp. (D. pomorum), Epicoccum sp. (E. nigrum*), *E. pedicellatum, Fusarium sp. (F. avenaceum, F. oxysporum, F. poae, F. proliferatum, F. redolens, F. solani, F. temperatum), Gibellulopsis sp., I. farinosa, Lecanicillium sp., L. leptobactrum, Meira sp., Meyerozyma sp., Microdochium sp. (M. bolleyi), M. bullatus, Moesziomyces sp., Neonectria*

sp., N. gorlenkoana, P. album, Penicillium sp., (P. amphipolaria, P. chrysogenum, P. crustosum, P. digitatum, P. expansum, P. olsonii), Penidiella sp., Periconia sp. (P. macrospinosa), Phlebia sp., Phoma sp. (P. eupyrena P. pomorum), P. pannorum, R. solani, Sarocladium sp. (S. spinificis, S. strictum), Setophoma sp. (S. terrestris), S. bisbyi, S. chinense, S. versicarium, Talaromyces sp. (T. aculeatus), Trichoderma sp. (T. asperellum, T. atroviride, T. hamatum, T. harzianum, T. koningii, T. viride), Verticillium sp., W. circinata.

Spośród 85 gatunków bądź rodzajów wyizolowanych grzybów, jedynie grzyby z rodzaju *Alternaria, Acremonium, Cladosporium, Phoma, Chaetomium, Fusarium* i *E. nigrum* opisane zostały w literaturze jako endofity grzybowe pszenicy [Larran i in., 2007 ; Vujanovic i in., 2012; Lenc i in., 2015; Nicolaisen i in., 2014, Rojas i in., 2020, Latz i in.2020]. Larran wraz ze współpracownikami [2002] wyizolowali 130 izolatów grzybów z liści pszenicy i zidentyfikowali 19 gatunków grzybów, w tym *B. sorokiniana, Alternaria sp., E. nigrum, Stemphylium sp., Phoma sp., Nigrospora* sp. w kolejnych badaniach, autorzy ci, przeanalizowali grzyby wyizolowane z liści, łodyg, plew oraz ziaren pięciu odmian pszenicy identyfikując 30 rodzajów grzybów [Larran i in., 2007]. Najczęściej obserwowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Cladosporium, Epicoccum, Fusarium* i *Penicillium*. Ofek-Lalzar i in. [2016] porównali bioróżnorodność grzybów występujących w *Triticum dicoccoides* i *A. sharonensis*. Do najczęściej występujących rodzajów grzybów zaliczono *Alternaria, Aspergillus, Chaetomium, Cladosporium i Stemphylium*. Latz wraz z współpracownikami [2020] wyizolowali 69 izolatów z liści pszenicy należących do rodzajów: *Penicillium, Lecanicillium, Acremonium, Epicoccum, Alternaria, Chaetomium* i *Phoma*. Rojas i in. [2020] zidentyfikowali 20 gatunków spośród 163 izolatów, otrzymanych z kłosów 2 odmian ozimych pszenicy. Struktura społeczności grzybów zasiedlająca kłosy pszenicy została zdominowana przez grzyby z rodzaju *Cladosporium* i *Alternaria*. Innymi rodzajami grzybów, które występowały w badanych kłosach były *Fusarium i Epicoccum*. Nicolaissen i in [2014] przeanalizowali grzyby bytujące w ziarniakach pszenicy wykorzystując metody niewymagające hodowli. Wykryto 173 OTU, które przypisano do takich rodzajów jak: *Alternaria, Cladosporium, Pyrenophora, Epicoccum, Fusarium, Microdochium, Phoma* i *Stemphylium*.

W pracy doktorskiej część ze zidentyfikowanych gatunków/rodzajów opisywana jest jako powszechne patogeny roślin uprawnych, w tym zbóż i pszenicy np. *F. poae, F. oxysporum, B. sorokiniana, R. solani, czy* grzyby z rodzaju *Arthrinium* i *Colletotrichum* [Beccari i in., 2016; Iftikhar i in., 2008; Mavragani i Abdellatif, 2007]. Natomiast większość wyizolowanych

w pracy gatunków nie została jak dotąd opisana jako endofity pszenicy. Tymczasem dane literaturowe wskazują, że grzyby z rodzaju *Sarocladium* często związane są z roślinami *Poaceae*, jak na przykład: *S. bacillisporum, S. bactrocephalum i S. strictum* [Tunali i in., 2000; Hormazabal i Piontelli, 2009]. *Sarocladium attenuatum, S. oryzae* i *S. sinense* wykryto u ryżu, a *S. zeae* jest znany jako endofit kukurydzy [Wicklow i in., 2005; Poling i in., 2008; Gromadzka i in, 2019; Błaszczyk i in., 2021].

W pracy uzyskano także pojedyncze izolaty z takich rodzajów jak: *Acremonium, Arthrinium, Backusella, Cadophora, Chaetomium, Colletotrichum, Gibellulopsis, Lecanicillium, Meira, Meyerozyma, Neonectria, Penidiella, Phlebia, Verticillium* oraz z gatunku *A. betulicola, A. conjuncta, A. westerdijkiae, B. sorokiniana, C. allicinum, C. candelabrum, Ch. pseudomerdarium D. pomorum, E. nigrum, F. temperatum, I. farinosa, L. leptobactrum, M. bullatus, P. amphipolaria, P. expansum, P. eupyrena, P. album, P. pannorum, R. solani, T. aculeatus,* T. *harzianum*. Wiadomo, iż grzyby *Chaetomium sp., Arthrinium sp., B. sorokiniana, E.nigrum* [Laran i in., 2002; Abdullah i Atroshi, 2014], oraz T. *harzianum* [Taheri i in., 2016; Błaszczyk i in., 2017], i *A.betulicola* [Lombard i in., 2016] występują w pszenicy. Rodzaj *Backusella* jak dotąd wyizolowano z ściółki leśnej i gleby z rezerwatu, w którym uprawiano cytrusy, eukaliptusy i sosny [de Souza i in., 2014], *Cadophora* z traw takich jak: *Ephedra dystachia, Festuca vaginata, Fumana procumbens* [Knapp i in., 2012], natomiast *Colletotrichum sp.* zidentyfikowano w *Andrographis paniculata* [Li i in., 2022] i truskawkach [Drobek i in., 2021], *Meyerozyma sp. w* drzewie *Protium heptaphyllum* [Fierro-Cruz i in., 2017], *Neonectria* w jabłkach [Gómez-Cortecero i in., 2016], *Penidiella* sp. w próbach pobranych z opuszczonych kopalni [Horiike i Yamashita, 2015], *Phlebia sp.* w *Piper hispidum* [Orlandelli i in., 2012]. Grzyby z rodzaju *Verticillium* wyizolowano z pieprzu i truskawki [Drobek i inni, 2021; Plăcintă i Murariu, 2016], *A.conjuncta* z *Pastinaca sativa* [Gannibal i in., 2022], *A. westerdijkiae* z kawy, winogron i pomarańczy [Diaz i in., 2009 Marino i in., 2009; Alvindia i de Guzman, 2016], *C. allicinum* z jęczmienia [Sandoval-Denis i in., 2016], *C. candelabrum* z rozkładających się liści [Ayers i in., 2010]. Gatunek *Ch. pseudomerdarium* opisano jako występujący w soi [Hamayun i in., 2009], *I. farinosa* wyizolowano z truskawek, piór ptaków wolno żyjących, osadów ściekowych i szczątków organicznych w wodach słodkich [Domsch i in., 1980] oraz z kornika [Kirschner, 2001] i ściółki z jodły balsamicznej [Harney i Widden, 1991]. *Moesziomyces bullatus* wykryto w endosferze traw z rodzaju *Leersia, Panicum, Paspalum, Pennisetum, Polytrias* [Li i in., 2019], P. *amphipolaria* wyizolowano z spróchniałego drewna [Das i in., 2020], P. *expansum*

zidentyfikowano w owocach takich jak jabłka czy gruszki [Luciano-Rosario i in., 2020], P. *eupyrena* zaobserwowano w ziemniakach [A'Hara, 2015], P. *album* wykryto na wielu budynkach dziedzictwa kulturowego od malowideł ściennych, kamienia, gipsu i cegły po szkło, drewno i papier [Leplat i in., 2020]. Kolejny gatunek jakim jest P. *pannorum* opisano jako powszechnie występujący w jaskiniach Europy i Ameryki Północnej [Out i in., 2016; Vanderwolf i in., 2019; Sanchez-Moral i in., 2021; Chaturvedi i in., 2018], a *L. leptobactrum* jako zasiedlający jaskinie na terytorium Francji, Hiszpanii i Niemiec [Bastian i in., 2009; Porca i in., 2011; Burow i in., 2019, Dominguez-Moñino i in., 2021]. W kwaśnych wodach w kopalni węgla wykryto T. *aculeatus* [Katar i in., 2017]. Natomiast rola tych grzybów jako endofitów pszenicy pozostaje nieznana, a zrozumienie zjawiska asocjacji tych gatunków grzybów z tkankami pszenicy wymaga dalszych badań.

6.2. Wpływ rośliny gospodarza na strukturę mykobiomu endosfery

W niniejszej pracy doktorskiej, do realizacji badań nad poznaniem społeczności grzybów zasiedlających tkanki pszenicy zwyczajnej, wykorzystano polskie odmiany wpisane do Krajowego Rejestru w latach 2005-2018, które według oceny agronomicznej spółek hodowlanych, należą do odmian umiarkowanie odpornych na choroby grzybowe. Wśród wytypowanych do analiz odmian, pięć reprezentowało formy jare: Arabella, Bombona, Kandela, Rospuda i Rusałka, a pięć formy ozime: Arkadia, Bamberka, Euforia, Legenda i Ostroga. Przeprowadzone badania wykazały, niezależnie od pozostałych badanych czynników (organów, warunków uprawy), że cztery odmiany: dwie formy ozimej - Bamberka i Legenda oraz dwie formy jarej - Bombona i Rusałka, charakteryzowały się najbardziej różnorodnym zbiorem grzybów endofitycznych. W odmianach tych najczęściej występującymi rodzajami grzybów były: *Fusarium., Sarocladium, Alternaria, Trichoderma, Penicillium i Cladosporium*. Wykazano natomiast, że najbardziej ubogą w grzyby endofityczne odmianą jest Arabella. Tutaj zidentyfikowano jedynie 18 gatunków/rodzajów grzybów, a wśród nich grzyby z rodzaju *Fusarium* (*F. solani, F. proliferatum, F. oxysporum*), grzyby z rodzaju *Penicillium* (*P. olsonii*), z rodzaju *Trichoderma* (*T. hamatum, T. viride*), *Sarocladium* (*S. spinificis*), jak również A. *sclerotigenum, C. candelabrum, E. pedicellatum, W. circinata* czy grzyby z rodzaju *Chaetomium*. Społeczność grzybów pozostałych odmian pszenicy była na porównywalnym poziomie. W dwóch odmianach pszenicy jarej: Bombona i Rusałka występowało najwięcej unikalnych gatunków/rodzajów grzybów. W odmianie Bombona były to: A. *westerdikiae, Gibellulopsis sp., L. leptobactrum, Meira sp., Penidiella sp., Verticillium sp.* natomiast w odmianie Rusałka: A. *betulicola, D. pomorum, F. temperatum, I. farinosa, M. bullatus,*

T. aculeatus. Pomimo różnic w składzie mykobiomu pomiędzy badanymi odmianami pszenicy, wartości wskaźników bioróżnorodności były podobne, co może świadczyć o braku wpływu genotypu rośliny na społeczność endofitów grzybowych.

Istnieje przekonanie, że rośliny mogą kontrolować skład gatunkowy grzybów poprzez ich rekrutację, najczęściej z gleby, pożytecznych dla nich mikroorganizmów [Arif i in., 2020; Hartmann i in., 2008]. Potwierdzeniem tego stanowiska są badania prowadzone z wykorzystaniem metod niewymagających hodowli, które wskazały na związek pomiędzy genotypem gospodarza a społecznością endofitów [Sapkota i in., 2015, 2017; Simonin i in., 2020; Latz i in., 2020]. Tymczasem w pracy Salamon i in. [2020] wykazano, że odmiana pszenicy orkisz Zollernspelz miała najbardziej unikalną kompozycję grzybów endofitycznych w korzeniach, jednak nie stwierdzono istotnego statystycznie wpływu genotypu gospodarza na mykobiom korzeni. W badaniach Comby i in. [2016] również nie stwierdzono wyraźnego wpływu odmiany na strukturę społeczności endofitów. Zarówno w niniejszej pracy doktorskiej, jak i badaniach Salamon i in. [2020] oraz Comby i in. [2016] wykorzystano do identyfikacji endofitów metody zależne od hodowli. Na tej podstawie można wnioskować, że jedynie wykorzystanie technik wysokoprzepustowego sekwencjonowania, jak w przypadku badań Sapkota i in. [2015, 2017] czy Latz i in. [2020], gdzie uwzględnia się obecność gatunków biotroficznych i wolnorosnących pozwala na szczegółowe zobrazowanie roli genotypu rośliny gospodarza w kształtowaniu struktury społeczności mikroorganizmów w endosferze. Co ciekawe, wykorzystując metody niewymagające hodowli, Zheng i in. [Zheng i in., 2021] odnotowali wpływ genotypu gospodarza na skład mykobiomu endosfery pszenicy, aczkolwiek zauważyli oni, że warunki wzrostu rośliny (środowisko) mają silniejszy wpływ niż odmiana.

6.3. Wpływ organu rośliny na strukturę mykobiomu endosfery

Realizowane w pracy badania obejmowały również analizę składu grzybów zasiedlających tkanki wewnętrzne czterech organów roślinnych: ziarniaków, liści, łodyg i korzeni. Uzyskane wyniki pokazały istnienie znaczących różnice w składzie mykobiomu pomiędzy częściami podziemnymi - korzeniami, a organami nadziemnymi. Badania pokazują, że grzyby endofityczne mogą kolonizować odrębne nisze ekologiczne i wykazują pewnego rodzaju „swoistość organową", która może wynikać z adaptacji niektórych gatunków do ściśle określonych warunków ekologicznych i fizjologicznych, charakterystycznych dla danego organu roślinnego [Larran i in., 2007; Comby i in., 2016]. Rodzajami, które najczęściej obserwowano w korzeniach były *Exerophillum, Fusarium, Microdochium, Penicillium, Periconia, Setophoma, Trichoderma*. Grzyby z rodzaju *Microdochium*, w szczególności *M.*

bolleyi [Comby i in., 2016], oraz *E. pedicellatum* [Özer i in., 2020], podobnie jak grzyby z rodzaju *Fusarium*: *F. avenaceum* [Salamon i in., 2020], *F. redolens* [Taheri i in., 2016; Salamon i in., 2020], *F. oxysporum* [Banerjee i Mittra, 2018] powszechnie identyfikowano w korzeniach pszenicy. Pojedyncze izolaty gatunków: *W. circinata* [Salamon i in., 2020], *I. farinosa* [da Silva Lopes i in., 2017] również identyfikowano w korzeniach pszenicy. Grzyby T. *harzianum* oraz *B. sorokiniana* zaobserwowano w korzeniach pszenicy durum [Taheri i n., 2016]. Poza powyższymi gatunkami w korzeniach badanych w ramach pracy doktorskiej odmian pszenicy zidentyfikowano również grzyby z rodzaju *Arthrinium* i *Epiccocum*, *Chaetomium* oraz *F. poae*. Wcześniejsze doniesienia wskazują, że grzyby z rodzaju *Arthrinium* [Bankina i in., 2017; Abdullah i Atroshi, 2014], i *Epiccocum* występują zazwyczaj w ziarniakach [Lazzaro i in., 2015; Bankina i in., 2017], natomiast grzyby z rodzaju *Chaetomium* i *F. poae* izolowano z liści i ziaren pszenicy [Istifadah i in., 2006; Kurowski i in., 2012]. Interesujący wydaje się fakt, iż rodzaje *Backusella, Lecanicillium, Neonectria,* oraz gatunki *P. eupyrena, P. pomorum, S. terrestris*, które zostały opisane w niniejszej pracy jako te zasiedlające endosferę korzeni pszenicy występują powszechnie w innych środowiskach. Grzyby w rodzaju *Backusella* wyizolowane zostały ze ściółki leśnej i gleby z rezerwatu, w którym uprawiają cytrusy, eukaliptusy i sosny [de Souza i in., 2014], *Neonectria sp.* z jabłkach [Saville i Olivieri, 2019], *Lecanicillium sp.* [Bhagyasree i in., 2018; Błaszczyk i in., 2021] i *P. pomorum* [Ramos Romero i in., 2021] z kukurydzy, *P. eupyrena* z ziemniaków [A'Hara, 2015], *S. terrestris* z cebuli i czosnku [Rivera-Mendez i in., 2019], a *P. macrospinosa* zwykle izolowana jest z korzeni traw [Mandyam i in., 2010].

W liściach dziesięciu odmian pszenicy najczęściej obserwowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Cladosporium, Fusarium, Penicillium, Sarocladium*. Zidentyfikowano również pojedyncze izolaty grzybów T. *hamatum,* T. *koningii,* P. *macrospinosa, Penidiella sp., N. gorlenkoana, Meira sp.,* A. *pullulans,* A. *westerdijkiae,* A. *lecanii,* A. *sclerotigenum*. Podobnie z liści pszenicy wyizolowano A. *infectoria* [Comby i in., 2016], *C. cladosporoides*, P. *macrospinosa* [Taheri i in., 2016], *F. oxysporum* i T. *hamatum* [Comby i in., 2016], drożdże A. *pullulans* [Vujanovic i in., 2012]. Co ciekawe, drożdże A. *pullulans* zostały opisane jako grzyby wytwarzające substancje polisacharydowe o wysokiej lepkości, umożliwiające adhezję do liści [Gaur i in., 2010], ułatwiając kolonizację tkanek jako endofity. Z liści pszenicy wyizolowano również grzyby, które w literaturze opisano jako występujące w pszenicy, ale w innych organach, np.: *P. crustosum* opisano jako grzyb związany z korzeniami [Salamon i in., 2020], A. *westerdijkiae* z ziarniakami [AL-Hussaini i Rahaif, 2021]. Warto zauważyć też,

że grzyby z rodzaju *Phoma* wykryto w liściach kukurydzy [Ramos Romero i in., 2021], a *S. strictum* w kolbach tego zboża [Błaszczyk i in., 2021].

W łodydze badanych w pracy odmian pszenicy najczęściej izolowano grzyby z rodzaju *Alternaria, Anthracocystis, Cladosporium, Fusarium, Penicillium, Sarocladium*. *Alternaria alternata* jest często opisywanym grzybem zasiedlającym łodygi pszenicy [Larran i in., 2007; (Xu i inni, 2018)], podobnie jak A. *infectoria* [Comby i in., 2016] czy *Cladosporium sp.*, [Taheri i in., 2016; Comby i in., 2016] oraz *F. oxysporum* [Banerjee i in., 2018]. Gatunek drożdży A. *pullulans*, który zidentyfikowano w niniejszej pracy w tkankach wewnętrznych liści, wykryto również w łodydze. Wynik ten potwierdza badania Vujanovic i in. [2012] oraz Gaur i in. [2010] świadczące o roli wydzielanej przez drożdże substancji o dużej lepkości umożliwiającej adhezję do łodyg czy liści roślin, a następnie kolonizację tkanek wewnętrznych. Grzyby z rodzaju *Cadophora* czy gatunki P. *macrospinosa* i *R. solani* najczęściej opisywano jako endofity korzeni pszenicy [Knapp i in., 2018; Taheri i in., 2016; Yakti i in., 2019; Özer i in., 2021]. *Stemphylium versicarium* izolowano z liści pszenicy [(Farag, Ghebrial, Abou Zeid i Atwa, 2022)], jednak znacznie częściej opisywany jest jako patogen liści pomidora [(Bessadat i inni, 2022)] czy cebuli [Arif i in., 2020]. Zidentyfikowano też grupę grzybów, które jak dotąd nie zostały opisane jako zasocjowane z roślinami pszenicy. Należą do nich m.in. *Ch. pseudomerdarium, L. leptobactrum,* P. pannorum, *Verticillium sp., Penicillium sp. Chrysosporium pseudomerdarium* wykryto w nasionach soi [Hamayun i in., 2009], a *S. strictum* w kolbach kukurydzy [Błaszczyk i in., 2021]. Grzyby z rodzaju *Verticillium* występują w truskawce [Drobek i in., 2021], a *M. bullatus* w trawach z rodzaju *Leersia, Panicum, Paspalum, Pennisetum, Polytrias* [Li i in., 2019]. Grzyby z rodzaju *Penicillium* najczęściej występują jako patogeny owoców cytrusowych czy jabłek [Vico i in., 2014]. *Leptobacillium leptobactrum* występuje w europejskich jaskiniach [Bastian i in., 2009; Porca i in., 2011; Burow i in., 2019], a *P. pannorum* zarówno w europejskich jaskiniach jak i w zlokalizowanych w Ameryce Północnej [Out i in., 2016; Vanderwolf i in., 2019; Sanchez-Moral i in., 2021].

Badania realizowane w ramach pracy doktorskiej pozwoliły na zidentyfikowanie w ziarniakach pszenicy 32 gatunków/rodzajów grzybów, przy czym najliczniej reprezentowane w tych częściach roślin były grzyby z rodzaju *Alternaria, Fusarium, Penicillium, Sarocladium*. Podobne spostrzeżenia odnotowali Tralamazza i in. [2016] w odniesieniu do grzybów *Alternaria sp.* i *Fusarium sp*. zidentyfikowanych w ziarniakach pszenicy zwyczajnej oraz Cavarelli i in. [2015], którzy opisali rodzaj *Fusarium* jako najliczniej kolonizujący ziarniaki pszenicy durum. Warto nadmienić, że grzyby z rodzaju *Alternaria* choć powszechnie bytują

w ziarniakach pszenicy [Ofek-Lalzar i in.2016], to występowanie tej grupy grzybów zależy od warunków uprawy roślin-gospodarza i gatunku grzyba [Müller i Korn, 2013]. W tym kontekście interesujący wydaje się zatem fakt, że w obecnej pracy grzyby z rodzaju *Alternaria* wykryto wyłącznie w ziarniakach zebranych z roślin wzrastających w warunkach polowych. Grzyby z rodzaju *Cladosporium* występowały w ziarniakach niezależnie od warunków uprawy, co jest zgodne z badaniami Kulik i in. [2015], którzy wskazywali na występowanie *Cladosporium sp*. w ziarniakach zarówno w uprawie konwencjonalnej jak i organicznej. W ziarniakach, niezależnie od warunków uprawy, zidentyfikowano również grzyby z rodzaju *Fusarium*. Należy podkreślić, że grzyby te zostały wyizolowane ze zdrowo wyglądających kłosów i ziarniaków. Zidentyfikowano w pracy 3 gatunki z rodzaju *Fusarium*: *F. oxysporum* (warunki polowe: uprawa tradycyjna), *F. proliferatum* (warunki szklarniowe), *F. temperatum* (warunki polowe: uprawa ekologiczna). Występowanie *Fusarium sp.* zależy od warunków uprawy, praktyki agronomicznej, miejsca doświadczenia czy opadów atmosferycznych i temperatury [Bankina i in, 2017]. Opady atmosferyczne oraz duża wilgotność podczas kwitnienia i dojrzewania roślin pszenicy sprzyja wnikaniu grzybów z rodzaju *Fusarium* do rośliny. Tymczasem w doświadczeniu polowym, podczas fazy kwitnienia, suma opadów wynosiła tylko 3,6 mm. Te niesprzyjające rozwojowi grzybów warunki pogodowe prawdopodobnie przyczyniły się do tak niskiego stopnia zasiedlenia tkanek pszenicy, w tym ziarniaków przez gatunki grzybów z rodzaju *Fusarium*. Niejako potwierdzają to badania Bankina i in. [2017], którzy zidentyfikowali większą liczbę gatunków z rodzaju *Fusarium* w ziarniakach pszenicy, jednakże w momencie kwitnienia roślin wilgotność powietrza i suma opadów była większa. W pracy zaobserwowano występowanie w ziarniakach pszenicy w warunkach kontrolnych kilku gatunków grzybów z rodzaju *Penicillium*: *P. chrysogenum, P. crustosum, P. digitatum, P. expansum* oraz *P. olsonii. Penicillium chrysogenum, P. crustosum* i *P. olsonii* wyizolowano również z roślin rosnących na polu. W literaturze, grzyby z rodzaju *Penicillium* zostały opisane jako pożniwne patogeny [Chen i in., 2019] przyczyniające się do strat żywności powodując choroby ziarna podczas przechowywania [Mohapatra i in., 2017]. Warto dodać, że *P. crustosum, P. digitatum* i *P. expansum* zostały zidentyfikowane jako patogeny cytrusów, gruszek i jabłek [Vico i in., 2014; Yang i in., 2018; (Luciano-Rosario i in., 2020]. W ziarniakach pszenicy zidentyfikowano również dwa gatunki *Sarocladium sp.*: *S. strictum* oraz *S. spinificis* pozyskane z tkanek roślin uprawianych w warunkach kontrolowanych, ponadto *S. strictum* również z roślin uprawianych na polu. Błaszczyk i in. [2021] wyizolowali *S. strictum* z ziaren kukurydzy. Również w ziarniakach pszenicy zaobserwowano grzyby z rodzaju *Moesziomyces*, które powszechnie występują

w nasionach kawy [Vega i in., 2008], grzyby A. *lecanii* (jako *L. lecanii*) opisane jako endofity ziarniaków kukurydzy [Błaszczyk i in., 2021], A. *sclerotigenum* w nasionach winorośli [Lo Piccolo i in., 2015]. W ziarniakach zaobserwowano również grzyby takie jak *P. album*, które zostały dobrze poznane i opisane jako grzyby występujące na budynkach sakralnych i dziedzictwa kulturowego [Leplat i in., 2020] czy *S. chinense*, które wyizolowane zostały w larw jedwabnika [Zhao i in., 2013]. Grzyby z rodzaju *Trichoderma,* jak np. *T. koningii* i *T. viride,* które wyizolowano z ziarniaków pszenicy badanych w niniejszej pracy, opisywane są jako mikroorganizmy glebowe i endofity korzeni [Otadoh i in., 2011]. Zidentyfikowany tutaj, *D. pomorum* (jako P. *pomorum*) jak dotąd pozyskano wcześniej z liści kukurydzy [Ramos Romero i in., 2021].

Grzyby z rodzaju *Alternaria, Cladosporium, Fusarium, Penicillium, Sarocladium* wykryto natomiast we wszystkich organach roślinnych. Odnajduje to swoje potwierdzenie w wynikach prac Comby i in. [2016] oraz Vujanovic i in [2012], którzy obserwowali w endosferze pszenicy *Cladosporium sp. Penicillium sp.* i *Sarocladium sp*. Grzyby z rodzaju *Fusarium* zostały zidentyfikowane w pszenicy przez Ripa i in., [2019] i Salamon i in. [2020]. Obecność gatunków *S. strictum,* P. *olsonii, F. proliferatum* których występowanie opisano we wszystkich organach roślinnych badanych w niniejszej pracy odmian pszenicy stwierdzono również w organach pszenicy jako wynik badań Esmaeili i in. [2016] oraz Rojas i in. [2020].

6.4. Wpływ strategii i warunków uprawy na strukturę mykobiomu endosfery

Badania realizowane w ramach pracy doktorskiej obejmowały również analizę wpływu warunków wzrostu roślin (warunki kontrolowane i polowe) i agrotechniki (uprawa konwencjonalna i uprawa bez zabiegów) na społeczność grzybów zasiedlających wewnętrzne tkanki pszenicy. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że na endosferę pszenicy znacznie większy wpływ ma mikrobiota występująca w glebie i powietrzu niż zabiegi agrotechniczne, w tym nawożenie mineralne i zastosowanie pestycydów. Rośliny w warunkach polowych wzrastały na tym samym polu i na tym samym typie gleby. Można więc przypuszczać, że pomimo fizycznego oddzielenia poletek roślin uprawianych konwencjonalnie od poletek roślin uprawianych bez zabiegów, rośliny te wzrastały w podobnych warunkach środowiskowych, o podobnym składzie mikrobioty. Dotychczasowe prace, w których porównywano społeczności mikroorganizmów związanych z ryzosferą roślin uprawianych w systemach ekologicznych i konwencjonalnych doprowadziły badaczy do różnych wniosków [Hartman, 2018, Lenc i in., 2015, Li i in., 2012]. Hartman i in. [2018] i Gdanetz i Trail [2017] zaobserwowali, że wpływ strategii zarządzania na skład mykobiomu roślinnego był

ograniczony. Natomiast Rascovan i in., [2016] udokumentowali wpływ strategii uprawy na społeczność mikroorganizmów w przypadku lokalizacji, które były znacznie oddalone geograficznie. Tymczasem Sharma-Poudyal i in. [2017] stwierdzili, że różnorodność grzybów związanych z pszenicą jest uzależniona od systemu uprawy. Do podobnych wniosków, po analizie wyników uzyskanych z wysokoprzepustowego sekwencjonowania doszli Mbuthia i in., [2015], Sale i in., [2015]; ,Wang Z. i in., [2016c]. Tymczasem Degrune i in. [2016] zauważyli, że różnorodność i bogactwo grzybów zmniejszyło się przy uprawie ekologicznej w porównaniu z uprawą konwencjonalną oraz, że kilka gatunków grzybów, które obserwowano w roślinach uprawianych metodą konwencjonalną nie zostało zidentyfikowanych w uprawie ekologicznej. Spostrzeżenia tych autorów są spójne z wynikami otrzymanymi w ramach niniejszej pracy doktorskiej, gdzie z roślin uprawianych w systemie konwencjonalnym wyizolowano 52 rodzaje bądź gatunki grzybów, a z roślin wzrastających w warunkach ekologicznych 33 gatunki bądź rodzaje. Potwierdzają to również uzyskane w tej pracy wartości wskaźników bioróżnorodności i równomierności. Przyczyną zidentyfikowania w uprawie tradycyjnej większej liczby grzybów niż w ekologicznej może być fakt, że niestosowanie środków ochrony roślin w uprawie ekologicznej przyczyniło się do rozwoju grzybów szybkorosnących i powszechnie występujących.

Różnice w społeczności enodfitów grzybowych występowały również pomiędzy roślinami wzrastającymi w warunkach kontrolowanych i polowych. Natomiast liczba zidentyfikowanych gatunków bądź rodzajów grzybów w roślinach uprawianych w warunkach kontrolowanych (28 gatunków/rodzajów) była na porównywalnym poziomie jak w uprawie ekologicznej. W roślinach zbieranych z pola dominowało kilka gatunków grzybów, co może świadczyć o ich konkurencyjności i zasiedlaniu endosfery pszenicy oraz zdolności do wzrostu szczególnie w mniej sprzyjających warunkach środowiskowych. W roślinach wzrastających na polu najczęściej obserwowano grzyby z rodzaju *Alternaria* (*A. alternaria, A. conjuncta, A. infectoria*), *Anthracocystis* (*A. flocculosa*), *Fusarium* (*F. avenaceum, F. oxysporum, F. poae, F. redolens, F. solani*), *E. pedicellatum, M. bolleyi,* P. *macrospinosa, S. terrestis*. Taksony te sklasyfikowane zostały na podstawie danych literaturowych jako patogeny pszenicy [Beccari i in., 2018; Meena i in., 2017; Perello i in., 2006], ale również ostrołukowej tykwy [Sarkar i in., 2019], dyni, rzepaku i cebuli [Ikeda i in., 2012; Yang i in., 2017]. Z roślin wzrastających w warunkach kontrolowanych wyizolowano grzyby z rodzaju *Penicillium* (*P. chrysogenum, P. crustosum, P. digitatum, P. expansum, P. olsonii*), *Sarocladium* (*S. spinificis*

i *S. strictum*), *Trichoderma* (*T. atriviride, T. asperellum, T. hamatum, T. harzianum, T. koningii, T. viride*) oraz *A. lecanii* i *F. proliferatum.*

Istnieje wiele doniesień literaturowych mówiących o tym, że uprawa bezorkowa lub uproszczona może nasilać choroby grzybowe pszenicy, zwłaszcza wywoływane przez patogeny bytujące w resztkach pożniwnych [Simón, i in. Börner i Struik, 2021]. Fuzarioza kłosów wywoływana przez *F. graminearum* nasila się, gdy resztki pożniwne pozostają na powierzchni gleby. Patogen ten może zimować i wytwarzać w słomie formy przetrwalnikowe. Fuzariozy wywoływane przez *F. pseudograminearum* i *F. culmorum* występują powszechnie i są jedną z przyczyn utraty plonów [Poole i in., 2013; Smiley i in., 2005]. Tymczasem niezależnie od zastosowanej agrotechniki w niniejszej pracy, zidentyfikowano *F. avenaceum, F. oxysporum* oraz *F. solani.* Dodatkowo w roślinach uprawianych na polu przy ekologicznym sposobie uprawy zidentyfikowano *F. termperatum,* a przy tradycyjnym sposobie uprawy *F. redolens* oraz *F. poae*. Natomiast *F. proliferatum* został zidentyfikowany w roślinach wzrastających w warunkach kontrolowanych oraz na polu, w systemie tradycyjnym. Występowanie grzybów z rodzaju *Fusarium* w roślinach uprawianych na polu potwierdzają badania prowadzone na świecie [Comby i in., 2016]. Inną grupą grzybów, na którą wpływa sposób uprawy jest m.in. *Rhizoctonia solani*, której wzrost liczby szczepów następuje po zaprzestaniu uprawy [Okubara i in., 2014]. Jest to sprzeczne, z wynikami przedstawionymi w niniejszej pracy, ponieważ *R. solani* zaobserwowano w roślinach uprawianych na polu w systemie tradycyjnym. W badaniach Fernandez i in. [2007] wykazano, że populacja *M. bolleyi* w korzeniach pszenicy w uprawie bezorkowej jest wyższa niż uprawie konwencjonalnej. Tymczasem wyniki prezentowane w tej pracy pokazują jednak obecność *M. bolleyi* na porównywalnym poziomie w korzeniach pszenicy uprawianej na polu w systemie ekologicznym jak i tradycyjnym.

6.5. Transmisja wertykalna i horyzontalna

Endofity grzybów są rekrutowane ze środowiska lub przenoszone endogennie przez nasiona [Klaedtke i in., 2016; Wassermann i in., 2019]. Przyjmuje się, że mikroorganizmy rekrutowane z środowiska występują sporadycznie, ponieważ ich obecność w roślinie jest bezpośrednio związana z otoczeniem, w którym wzrasta. Tymczasem obecność mikroorganizmów, bytujących w roślinie, niezależnie od warunków środowiska jest bardziej stabilna i często mikroorganizmy te określa się *core microbiome* [Neu i in., 2021]. Co ważne, wiele gatunków grzybów może być transmitowana zarówno wertykalnie jak i horyzontalnie. Sposób transmisji mikroorganizmów może znacznie wpłynąć na skład, a tym samym na

funkcjonalność społeczności grzybów endofitycznych. Oprócz sposobu transmisji do rośliny, na skład mykobiomu roślinnego mają wpływ warunki środowiskowe, gatunki roślin – gospodarzy, zmiany fizjologiczne w trakcie rozwoju roślin oraz różnice anatomiczne organów roślinnych, co komplikuje rozróżnienie gatunków pochodzenia zewnętrznego i endogennego. W prezentowanej pracy doktorskiej podjęto również badania mające na celu wyjaśnienie sposobu przenoszenia się endofitów ze środowiska do roślin – transmisja horyzontalna oraz z jednego pokolenia pszenicy na kolejne – transmisja wertykalna.

Zaobserwowano różnice w składzie i liczebności społeczności grzybów endofitycznych w roślinach dwóch generacji (G1 i G2). Endofitami, które występowały w obu generacjach są grzyby z rodzaju *Trichoderma* (*T. koningii*, T. *hamatum*), *Fusarium* (*F. proliferatum*), *Cladosporium*, A. *lecanii*, P. *crustosum*, P. *olsonii*. Odnotowano wyższą bioróżnorodność grzybów wyizolowanych z wszystkich badanych odmian pszenic generacji G1, potwierdzoną wartościami wskaźników bioróżnorodności. Może ona wynikać z pochodzenia nasion wykorzystanych jako materiał siewny w celu uzyskania roślin generacji G1. Nasiona te zostały pozyskane bezpośrednio od różnych spółek hodowlanych, można więc zakładać, iż rośliny mateczne wzrastały w różnych warunkach polowych i miały bezpośredni kontakt ze środowiskiem. Natomiast rośliny generacji G2 uzyskano już z nasion roślin wzrastających w autoklawowanej glebie, w warunkach kontrolowanych, ograniczających kontakt roślin ze środowiskiem zewnętrznym. Wiewióra i in. [2015] badali sposób transmisji grzybów z rodzaju *Neothypodium* w życicy wieloletniej (*Lolium perenne* L.) i zaobserwowali mniejszą liczbę endofitów grzybowych w nasionach roślin potomnych niż w nasionach roślin matecznych. Niewiele w literaturze badań skupiających się na sposobie transmisji grzybów endofitycznych w pszenicy. Moreira i in. [2020] analizowali społeczność grzybów nasion pszenicy dwóch pokoleń roślin z wykorzystaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania. Zaobserwowali oni, że na społeczność grzybów największy wpływ ma strategia uprawy, jak również pokolenie. W roślinach potomnych zaobserwowano mniejszą różnorodność taksonomiczną grzybów w porównaniu do roślin matecznych, co jest zbieżne z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy.

Analizując wpływ genotypu rośliny na obecność grzybów endofitycznych w dwóch generacjach zaobserwowano, że *F. proliferatum* występuje w odmianach ozimych pszenicy: Arkadia, Bamberka, Euforia, Legenda i Ostroga, natomiast grzyby z rodzaju *Trichoderma* występują w odmianie jarej Bombona. Zaobserwowano również, że grzyby z rodzaju *Trichoderma* i *Fusarium* występują w korzeniach roślin pszenicy niezależnie od generacji. Nie

znaleziono danych literaturowych, które analizowałyby społeczność endofitów w poszczególnych organach roślinnych w kilku pokoleniach pszenicy.

Tymczasem badania z wykorzystaniem aksenicznych siewek pszenicy traktowanych grzybami: T. *hamatum, P. olsonii, P. expansum, F. proliferatum, C. candelabrum, N. gorlenkoana, P. album, S. spinificis, S. strictum* oraz mieszaniną tych grzybów, wykazały obecność grzybów z rodzaju *Penicillium* (*P. expansum* i P. *olsonii*), *F. proliferatum* i T. *hamatum* w tkankach tych roślin 7 dni po inokulacji. Nie zaobserwowano natomiast kolonizacji tkanek grzybami wolnorosnącymi takimi jak *S. spinificis, C. candelabrum, P. album*, co może wskazywać, że czas, który upłynął od inokulacji był zbyt krótki, aby grzyby mogły skolonizować tkanki. Istnieje również przypuszczenie, że warunki środowiskowe (sterylna gleba – piasek kwarcowy) nie sprzyjały wzrostowi tych grzybów. Prowadzono już badania dotyczące sposobu przemieszczania się grzybów endofitycznych w tkankach roślinnych. Wiewióra i in. [2015] analizowali sposób przemieszczania się grzybów z rodzaju *Neothypodium* w życicy wieloletniej (*Lolium perenne* L.) uprawianej na poletkach doświadczalnych. Zauważyli oni, że na średnie porażenie endofitami badanych roślin miało wpływ położenie rośliny w polu (rośliny krawędziowe lub środkowe). Ich zdaniem świadczy to o poziomej transmisji endofitów między roślinami, zwłaszcza rosnącymi obok siebie. Zaobserwowano również, że endofity grzybów (gromada Ascomycota i grupa *Coelomycetes*) występujących w dębach, są przenoszone poziomo przez owady roślinożerne [Faeth i Hammon, 1997]. Iannone i in. [2017] zasugerowali, że pozioma transmisja endofitów z rodzaju *Neothypodium* z roślin zainfekowanych na niezainfekowane ma miejsce również w trawach *Bromus auleticus* w Afryce Południowej.

Wyniki przedstawione w pracy doktorskiej wskazują, że *F. proliferatum* zasiedlający polskie odmiany pszenicy zwyczajnej, jest przenoszony zarówno wertykalnie, jak i horyzontalnie. Natomiast obecność grzybów z rodzaju *Trichoderma* i *Penicillium* w obu pokoleniach może wskazywać na zdolność tych grzybów do transmisji wertykalnej, aczkolwiek potwierdzenie tej opinii wymaga dalszych badań, jako że przeprowadzony w pracy schemat doświadczeń nie umożliwił obserwacji transmisji danego szczepu.

6.6. Znaczenie gatunków grzybów endofitycznych

W niniejszej pracy wyizolowano grzyby z rodzaju *Acremonium* (*A. sclerotigenum*), *Trichoderma* (*T. atroviride, T. hamatum, T. harzianum, T. koningii, T. viride*), *Talaromyces*, jak również *Ch. pseudomerdarium*, które potencjalnie mogą mieć pożyteczny wpływ na wzrost i rozwój roślin. Grzyby z rodzaju *Trichoderma* stymulują wzrost roślin, ułatwiają pobieranie składników odżywczych z gleby. Stwierdzono, że *T. harzianum* ma zdolność rozpuszczania

fosforanów i mikroelementów, które mogą być wówczas dostępne dla roślin [Li i in., 2015]. *Trichoderma harzianum* i *T. viride* zwiększają długość korzeni i pędów ryżu oraz pomidora [(Balasubramanian i in., 2014; Shukla i in., 2012]. Udokumentowano, że po inokulacji gatunkiem T. *viride* kiełkowanie nasion, długość korzeni, długość pędów, świeża i sucha masa oraz wskaźnik wigoru były istotnie zwiększone w bawełnie [Shanmugaiah i in., 2009]. Zaobserwowano, że *Trichoderma koningii*, który skolonizował korzenie *Lotus japonicas*, wytwarzał flawonoidy i fitoaleksinvesitol oraz zwiększał suchą masę tych roślin [Masunaka i in., 2011]. Wykazano również, że grzyby z rodzaju *Trichoderma* wytwarzają lotne związki organiczne (ang. *Volatile Organic Compounds*, VOC), które zostały uznane za kluczowe czynniki w promowaniu wzrostu [Garnica-Vergara i in., 2016; Kanchiswamy i in., 2015]. 6-pentylo-2H-piran-2-on (6-PAP) jest związkiem wykrywanym w kilku gatunkach *Trichoderma*, w tym głównie *T. atroviride* [Reithner i in., 2005; Stoppacher i in., 2010, Jeleń i in., 2014], *T. asperellum* [Wickel i in., 2013; Kottb i in., 2015], *T. viride* [Collins i Halim, 1972], *T. harzianum* [Claydon i in., 1987], *T. koningii* [Simon i in., 1988], *T. hamatum* [Jeleń i in., 2014]. Wykazano, że związek ten pochodzący z grzybów z rodzaju *Trichoderma* indukuje tworzenie korzeni bocznych u *A. thaliana* [Garnica-Vergara i in., 2016]. *Chrysosporium pseudomerdarium* wyizolowany z nasion soi, zwiększał długość pędów roślin i zawartość chlorofilu poprzez wytwarzanie giberelin promujących wzrost roślin [Hamayun i in., 2009]. Natomiast gatunek *A. pullulans* ma właściwości przeciwbakteryjne, dzięki wydzielaniu wielu związków chemicznych, takich jak np. kwas akrylowy czy kwas butanodiowy [Su i Niu, 2018]. Grzyby z rodzaju *Talaromyces,* podobnie jak *A. pullulans,* wykazują zdolność do syntezy związków bioaktywnych, o właściwościach antybiotycznych i przeciwdrobnoustrojowych mogących mieć zastosowanie w medycynie, rolnictwie i różnych gałęziach przemysłu. Wykazano, iż altenuzyna i dehydroaltenuzyna, wytwarzane w dużych ilościach przez grzyby z rodzaju *Talaromyces,* są inhibitorami sfingomielinazy, mają właściwości przeciwnowotworowe, przeciwgrzybicze i przeciw pierwotniakom z rodzaju *Trypanosoma* wywołującym chorobę Chagasa [Su i Niu, 2018]. Metabolity te wykazują też silne działanie przeciwgrzybicze względem *Aspergillus fumigatus* i *Candida albicans* [Komai i in., 2006]. Tymczasem grzyby z rodzaju *Acremonium* wyizolowane z kostrzewy strzelistej zidentyfikowano jako producentów IAA [(De Battista i in., 1990]. Wytwarzanie IAA i sideroforów zaobserwowano w *A. sclerotigenum* wyizolowanym z *Terminalia bellirica* [Prathyusha i in., 2015]. Natomiast Llorens i in. [2019] wykazali, że *A. sclerotigenum* 13237 wyizolowany z *A. sharonensis*, zwiększał tolerancję na stres suszy. Te dane literaturowe wskazują, iż powyższe gatunki i rodzaje grzybów wyizolowane z endosfery pszenicy mogą być

wykorzystane w dalszych badaniach nad wykryciem potencjalnych czynników kontroli biologicznej lub biostymulatorów.

W prezentowanej pracy z endosfery pszenicy wyizolowano również gatunki grzybów, które powszechnie znane są jako patogeny pszenicy, np. *F. poae* i *F. avenaceum* [Beccari i in., 2016], *F. oxysporum* [Beccari i in., 2016], *B. sorokiniana* [Alkan i in., 2022], *R. solani* [Lisiecki i in., 2022], *Arthrinium sp.*[Mavragani i in., 2007] i *Colletotrichum sp*. [Iftikhar i in., 2008]. Warto dodać, że grzyby z rodzaju *Arthrinium* są również patogenami jęczmienia [Martínez-Cano i in., 1992], a grzyby z rodzaju *Colletotrichum*, wywołują antraknozy u roślin drzewiastych i zielnych. Infekują przeważnie truskawki, mango, cytrusy, awokado, banany, kawę, ale też kukurydzę, trzcinę cukrową i sorgo [Cannon i in., 2008]. Grzyby z rodzaju *Fusarium* są jednymi z najczęstszych patogenów atakujących rośliny uprawne, w tym pszenicę, wywołujące choroby zwane fuzariozami [Balmas i in., 2015]. Do najczęściej występujących należą *F. avenaceum* i *F. poae*, wyizolowane w niniejszej pracy, a także *F. culmorum, F. graminearum. F. pseudograminearum, F. tricinctum, F. equiseti, F. langsethiae* i *F. sporotrichioides* [Czaban i in, 2015; Nielsen i in., 2011]. Gatunki te zdolne są do wytwarzania mykotoksyn, w tym zearalenonu (ZEA), moniliforminy (MON), beauwerycyny (BEA), enniatyn (EN) i trichotecenów, takich jak deoksyniwalenol (DON), niwalenol (NIV), 3- i 15-acetylo-DON (3-AcDON, 15-AcDON), toksyna HT-2 i T-2 [Zhu i in., 2019; Kriss i in., 2012]. Grzyby z rodzaju *Alternaria,* a szczególnie *A. alternata* są szeroko rozpowszechnionymi patogenemi wielu ważnych gospodarczo roślin, w tym zbóż, jak np. pszenicy, rzepaku, jabłek, brokułów, kalafiora, ziemniaków, pomidorów, owoców cytrusowych, gruszek, truskawek i tytoniu [Meena i in., 2017]. *Alternaria alternata* wytwarza ponad 70 fitotoksyn, w tym alternariol (AOH), eter monometylowy alternariolu (AME), kwas tenuazonowy (TeA), altenuen (ALT) i tentoksynę (TEN), które zostały uznane przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) za potencjalne czynniki ryzyka dla zdrowia ludzi [Meena i in., 2017; (CONTAM)., 2011]. Natomiast *A. infectoria* występująca w zbożach, m.in. w pszenicy powodując zgorzel jej siewek [Perelló i in., 2008]. Oprócz wywoływania chorób roślin, grzyby z rodzaju *Alternaria,* w szczególności *A. alternata* i *A. infectoria,* zostały opisane jako czynniki wywołujące podskórną grzybicę dziąseł i grzybicze zapalenie rogówki [Pastor i Guarro, 2008] oraz alergiczny nieżyt nosa i astmę [Knutsen i in., 2012].

Niektóre zidentyfikowane w pracy gatunki są znane jako patogeny innych roślin niż pszenica; należą do nich *F. proliferatum, M. bullatus, Neonectria sp., N. gorlenkoana* (syn. *N. oryzae*) *P. digitatum, P. crustosum, P. expansum, P. macrospinosa, S. terrestris, S. strictum,*

S. versicarium, Verticillium sp. Grzyby z rodzaju *Neonectria* są patogenami infekującymi drzewa [Weber i Børve, 2021; Karadžić i in., 2020], *S. terrestris* powoduje różową zgniliznę korzeni dyni, rzepaku i cebuli [Ikeda i in., 2012, Yang i in., 2017]. *Fusarium proliferatum* ma szeroki zakres gospodarza roślinnego; występuje od kukurydzy do mango [Leslie i in., 2007], przez kasztanowca [Kushiro i in., 2012] po banana [Li i in., 2012] i ryż [Park i in., 2005]. *Penicillium digitatum* zidentyfikowano jako patogen cytrusów, wywołujący zieloną pleśń [Chen i in., 2019]. *Penicillium crustosum* i P. *expansum* zostały sklasyfikowane jako patogeny cytrusów, gruszek i jabłek [Vico i in., 2014; Yang i in., 2018; Luciano-Rosario i in., 2020]. Grzyby z rodzaju *Verticillium* zidentyfikowano jako patogeny pieprzu i truskawki [Drobek i in., 2021, Plăcintă i Murariu, 2016]. *Moesziomyces bullatus* występuje jako patogen, wywołujący chorobę głownia prosa perłowego [Diagne-Leye i in., 2010]. Kolejnym grzybem endofitycznym wyizolowanym z badanych roślin pszenicy jest *Stemphylium vesicarium*. Grzyb jest znany jako patogen powodujący ważne choroby liści *Allium sp*. oraz szeregu roślin ozdobnych i drzewiastych oraz warzyw [Hay i in., 2021]. Tymczasem *P. macrospinosa,* który wcześniej został opisany jako korzystny endofit [Mandyam i in., 2010], na podstawie badań Sarkar i in. [2019] wykazano, że gatunek ten jest patogenem powodującym martwicę liści ostrołukowej tykwy znalezionej w Indiach. Również grzyby z rodzaju z *Nigrospora* są związane z roślinami o dużym znaczeniu gospodarczym, takimi jak ryż, banany czy rośliny ozdobne. Charakter tych asocjacji jest patogeniczny, choć gatunki *Nigrospora* mogą występować jako endofity [Hao i in., 2020; Wang i in., 2016]. Do patogenów roślinnych zalicza się głównie *N. oryzae* (syn. *N. gorlenkoana), N. sphaerica i N. musae,* które powodują zarazę łodyg na różnych żywicielach roślin, w tym ryżu, gorczycy brunatnej i herbacie w Chinach. *Nigrospora oryzae* jest również przyczyną zgnilizny kolby kukurydzy [Wang i in., 2016]. *Sarocladium strictum* w literaturze opisywany jest jako patogen kukurydzy [Tagne i in., 2002] i truskawki [Racedo i in., 2013]. Jest też również gatunkiem o znaczeniu klinicznym. Pojawiły się bowiem doniesienia o infekcjach *S. strictum* u ludzi, gdzie najczęściej izolowano go z skóry i krwi [Perdomo i in., 2011; Pérez-Cantero i Guarro, 2020]. Infekcja *S. strictum* jest również przyczyną wystąpienia zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych u osób z zaburzoną odpornością [Yao i in., 2019].

Ponadto w pracy zidentyfikowano wiele gatunków grzybów o nierozpoznanym wpływie na rośliny pszenicy, w tym gatunki z rodzaju *Meira* i *Penidiella* oraz *C. cladosporoides, L. leptobactrum,* P. *album,* P. *pannorum*. Wykazano jak dotąd, że grzyby z rodzaju *Penidiella* (szczep T9) są zdolne w warunkach *in vitro* do akumulacji dysprosium –

pierwiastka z grupy pierwiastków ziem rzadkich [Horiike i Yamashita, 2015]. Gatunki *Meira* są zwykle rozmieszczone w tkankach roślin lub na powierzchni liści [Yasuda i in., 2006; Limtong i in., 2017]. Obecność *P. album* stwierdzono badając budynki dziedzictwa kulturowego od malowideł ściennych, kamienia, gipsu i cegły po szkło, drewno i papier [Leplat i in., 2020], *P. pannorum* występuje powszechnie w jaskiniach Europy i Ameryki Północnej [Out i in., 2016; Vanderwolf i in., 2019; Sanchez-Moral i in., 2021; Chaturvedi i in., 2018], a *L. leptobactrum w* jaskiniach znajdujących się na terytorium Francji, Hiszpanii i Niemiec [Bastian i in., 2009; Porca i in., 2011; Burow i in., 2019, Dominguez-Moñino et al., 2021]. *Cladosporium cladosporioides* jest według literatury pospolitym i kosmopolitycznym saprobiontem [Bensch i in., 2010]. Gatunek ten został wykryty jako wtórny patogen na nekrotycznych organach różnych roślin żywicielskich. Według doniesień *C. cladosporioides* jest przyczyną wielu problemów zdrowotnych u ludzi, w tym infekcji płuc i skóry [Sandoval-Denis i in., 2016]

6.7. Wpływ grzybów endofitycznych na reakcje odpornościowe pszenicy.

Rośliny przystosowały się do różnych mechanizmów radzenia sobie ze stresem zarówno biotycznym jak i abiotycznym na poziomie morfologicznym, fizjologicznym, biochemicznym i genetycznym, aby umożliwić im przetrwanie w niesprzyjających warunkach [Huber i Bauerle, 2016]. Rośliny reagują na atak patogenów za pomocą uwarunkowanego genetycznie układu odpornościowego składającego się z odporności wyzwalanej przez PAMP (PTI – ang.: *PAMP triggered immunity*) i odporności wyzwalanej przez efektor (ETI – ang.: *elicitors triggered immunity*) [Abdul Malik i in., 2020]. PTI reprezentuje mechanizm wczesnego reagowania, w którym pośredniczą receptory rozpoznawania wzorców (PRR- ang.: *patern recognition receptor*), które następnie wiążą PAMP [Nürnberger i Kemmerling, 2009]. ETI jest reakcją na efektory wydzielane przez patogeny zakłócające PTI. Ta druga bariera obronna rekrutuje białka oporności (R), które specyficznie rozpoznają efektory patogenów i zwykle wywołują reakcję nadwrażliwości i śmierć komórki [Abdul Malik i in., 2020]. Białka szoku cieplnego (HSP – ang. *heat shock proteins*) m.in.: Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 i Hsp101, które tworzą jedną z najbardziej wszechobecnych klas białek chaperonowych, biorą udział w różnych procesach biologicznych. u zwierząt HSP bezpośrednio stymulują komórki układu odpornościowego, co sugeruje, że są jego aktywatorami [Cui i in., 2011]. Na przykład stres cieplny indukuje syntezę Hsp70 i promuje tolerancję krewetek (*Penaeus vannamei*) na stres ciepła, czy obecność metali [Sung i in., 2018], a także zapobiega niewydolności serca lub starzeniu się u ludzi [Ranek i in., 2018]. Tylko w kilku gatunkach roślin zbadano ekspresję genu HSP70. Należą do nich

jęczmień (*Hordeum vulgare* L.) [Landi i in., 2019], *Brachypodium distachyon* L., Beauv. [Wen i in., 2017], A. *thaliana* [Leng i in., 2017] oraz topola kalifornijska (*Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray) [Yer i in., 2018]. Roślinne Hsp70 są zlokalizowane w cytozolu, retikulum endoplazmatycznym, mitochondriach, chloroplastach i peroksysomach [Sung i in., 2001]. Chociaż przeprowadzono ograniczone badania funkcjonalne roślinnych Hsp70, uważa się, że białka HSP70 są integralną częścią odporności roślin i uczestniczą zarówno w odpowiedziach PTI, jak i ETI. Pełnią wiele funkcji w roślinach i działają jak Hsp70 opisane u innych organizmów eukariotycznych.

Wyniki badań przedstawionych w pracy wskazują na ograniczoną ekspresję genu *HSP70* po traktowaniu *F. proliferatum* E202, *P. olsonii* E69_1 oraz mieszaniną grzybów w 7 dniu po inokulacji. Natomiast po traktowaniu *P. expansum* E193 i *T. hamatum* E81w 7 dniu po inokulacji zaobserwowano nadekspresję genu *HSP70*. Warto zauważyć, że profile ekspresji *HSP70* są różne w zależności jakim szczepem roślina była inokulowana, co może oznaczać, że szczepy te wywołują różną odpowiedź u roślin pszenicy na poziomie badanego białka szoku cieplnego. Podobne wyniki uzyskali Guo i in. [2021], którzy badali poziom ekspresji genu *HSP70* w pszenicy po inokulacji *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* oraz *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. Chunduri i in. [2021] badali wpływ stresu cieplnego na ekspresję genu *HSP70* w pszenicy i wykazali spadek ekspresji do 14 dnia po ekspozycji na stres, natomiast Kumar i in. [2014] wzrost ekspresji genu *HSP70* po 2 godzinach stresu cieplnego. Tak różna reakcja pszenicy na stres może mieć związek z czasem jaki upłynął od kontaktu z czynnikiem stresowym. W pracy doktorskiej analizowano siewki w 7 dniu po inokulacji. Zakłada się, że w pierwszych godzinach po traktowaniu roślin badanymi szczepami jak również w późniejszym niż tygodniowy okres inkubacji odpowiedź na rośliny na poziomie genu *HSP70* również byłaby odmienna. Wpływ traktowania roślin tymi gatunkami (*F. proliferatum* E202, *P. olsonii* E69_1, *P. expansum* E193 i *T.hamatum* E81) w 7 dniu inokulacji uwarunkowany jest najprawdopodobniej też genotypem rośliny/odmianą pszenicy. Analizując ekspresję genu *HSP70* zaobserwowano jej spadek ekspresji tego genu w siewkach odmiany Arabella, Arkadia, Bamberka Bombona, Ostroga, Rospuda i Rusałka po traktowaniu *F. proliferatum* E202. Tymczasem inokulacja *F. proliferatum* E202 wywołała nadekspresję genu *HSP70* siewkach pszenicy odmiany Euforia, Kandela i Legenda. Po traktowaniu siewek pszenicy odmiany Arabella, Arkadia, Euforia, Ostroga, Rospuda i Rusałka *P. olsonii* E69_1 odnotowano spadek ekspresji genu *HSP70*, natomiast w siewkach odmian Bamberka, Bombona i Kandela zaobserwowano wzrost ekspresji badanego genu, a w siewkach odmiany Legenda nie zaobserwowano różnic między roślinami traktowanymi a roślinami kontrolnymi. Po

traktowaniu siewek pszenicy odmiany Arabella, Arkadia, Bamberka Bombona, Euforia, Ostroga i Rusałka mieszaniną grzybów zaobserwowano spadek ekspresji genu *HSP70*, natomiast w odmianie Kandela i Legenda zaobserwowano nadekspresję tego genu. w siewkach odmiany Rospuda nie zaobserwowano różnic między roślinami traktowanymi a kontrolnymi. Szczep *P. expansum* E193 w siewkach odmian Arabella, Bombona, Ostroga, Rospuda i Rusałka wpłynął na obniżenie poziomu ekspresji genu *HSP70* w porównaniu do roślin kontrolnych. Natomiast w siewkach odmian Arkadia, Bamberka, Euforia, Kandela i Legenda po traktowaniu *P. expansum* E193 poziom ekspresji był wyższy. *Trichoderma hamatum* E81 w siewkach pszenicy wywołał spadek ekspresji genu *HSP70 u* odmiany Arabella, Bamberka, Ostroga i Rusałka i jego wzrost w siewkach odmian Arkadia, Bombona, Euforia, Kandela, Legenda i Rospuda. Dane te wskazują, że niezależnie od szczepu/gatunku grzyba traktowanie roślin odmian Arabella, Ostroga i Rusałka wywołało spadek ekspresji genu *HSP70*. Natomiast w siewkach odmiany Kandela niezależnie od traktowania mikroorganizmem ekspresja genu *HSP70* była podwyższona. Świadczy to najprawdopodobniej o tym, że reakcja ta była zależna od odmiany, a nie od genotypu grzyba. Nie udało się natomiast znaleźć danych literaturowych, które opisywały badania wpływu odmiany/genotypu roślin pszenicy traktowanych grzybami na ekspresję genu *HSP70*. Podobnie brak jest wiedzy dotyczącej wpływu wymienionych wyżej gatunków grzybów na ekspresję genu *HSP70* u pszenicy. Tymczasem inni badacze wskazują, że wpływ na odpowiedz roślin na ich interakcje z mikroorganizmami, głównie patogenicznymi, może mieć odporność odmian. W badaniach prowadzonych przez Kubienova i in. [2013] wykorzystano trzy gatunki pomidora wystawione na działanie wysokich i niskich temperatur wraz z infekcją przez *Phytophthora infestans*. Wskazano, że czynniki te wywołują zwiększoną ekspresję genów *HSP70* i zwiększoną syntezę białek HSP70, aczkolwiek wzrost liczby białek HSP70 stwierdzono jedynie u roślin podatnych odmian pomidora poddanych stresowi wysokiej temperatury. Natomiast u roślin odpornych zaobserwowano wyłącznie wzrost ekspresji genów kodujących te białka, przy braku wzrostu liczby białek. Natomiast w badaniach Kallamadi i in. [2018], gdzie badano ekspresję genu *HSP70* u słonecznika po infekcji mączniaka, zaobserwowano większy wzrost ekspresji genu *HSP70* w odmianach odpornych niż w podatnych na infekcję patogena. Badania donoszą również, że ekspresja genów *HSP* pozytywnie reguluje aktywność enzymów. Zaobserwowano, że u *Arabidopsis* nadekspresja *HSP17.8* zwiększyła aktywność SOD, a w tytoniu nadekspresja *HSP16.9* zwiększyła aktywność POD, CAT i SOD [Driedonks i in., 2015]. Podobną zależność zaobserwowano w niniejszej pracy w siewkach odmiany Bombona i Kandela po traktowaniu *P. olsonii* E69_1. Wykazano tutaj zarówno nadekspresję genu *HSP70* jak i *SOD* (dymutaza ponadtlenkowa).

Podobną zależność zaobserwowano w siewkach pszenicy Kandela i Legenda po traktowaniu *F. proliferatum* E202, *P. expansum* E193 oraz *T. hamatum* E81.

Dysmutaza ponadtlenkowa (*SOD*) bierze udział w sygnalizacji i redukcji reaktywnych form tlenu wytwarzanych w wyniku stresu biotycznego i abiotycznego. Ekspresja tego genu w siewkach pszenicy po traktowaniu *F. proliferatum* E202, *P. olsonii* E69_1, *P. expansum* E193, *T. hamatum* E81 oraz mieszaniną grzybów była niższa w porównaniu do kontroli. Prowadzono badania, w których wykazano wpływ grzybów z rodzaju *Trichoderma* na ekspresję genu kodującego dysmutazę ponadtlenkową. Aamir i in. [2019] analizowali aktywność SOD u pomidora po inokulacji przez *Trichoderma erinaceum* oraz *F. oxysporum* (FolC). Stwierdzono, że aktywność SOD wzrastała wraz z czasem inkubacji (do 72h), a następnie spadała. Najwyższą aktywność enzymu SOD zanotowano po upływie 48h od inokulacji. W pracy doktorskiej analizowano natomiast ekspresję genu *SOD* dopiero po upływie 7 dni od inokulacji. Opierając się na wynikach badań Aamir i in. [2019] i własnych obserwacjach można przypuszczać, że przyczyną obniżonej ekspresji genu *SOD* większości badanych odmian pszenicy jak np. Arkadia, Bamberka, Rospuda i Rusałka traktowanych *F. proliferatum* E202, w siewkach odmian Arabella, Arkadia, Bamberka, Bombona, Ostroga, Rospuda i Rusałka traktowanych mieszaniną grzybów i w odmianach Arabella, Arkadia, Bombona, Bamberka, Euforia, Rospuda i Rusałka traktowanych *T. hamatum* E83 był dłuższy czas, jaki upłynął od inokulacji roślin do ich analizy. Traktowanie roślin obydwoma gatunkami *Penicillium -P. expansum* E193 i *P. olsonii* E69_1 dało zbieżne wyniki ekspresji genu kodującego dysmutazę ponadtlenkową. W przypadku takich odmian jak: Arabella, Arkadia, Bamberka, Rospuda i Rusałka, zaobserwowano obniżenie ekspresji tego genu, w odmianach Kandela i Legenda, odnotowano niższą ekspresję genu *SOD* niż w roślinach kontrolnych, natomiast u odmiany Euforia nie zaobserwowano różnic między traktowaniem a kontrolą. Różne wyniki uzyskano jedynie dla roślin odmiany Bombona i Ostroga.

Dane literaturowe pokazują wpływ odmiany na ekspresję genu *SOD*. Przykładem są badania aktywności genu dysmutazy ponadtlenkowej w siewkach 5 odmian jęczmienia po inokulacji *Pyrenophora teres* f. *teres* [Kunos i in., 2022]. Podobne obserwacje poczyniono w niniejszej pracy. Odnotowano spadek ekspresji genu *SOD w* odmianach Arkadia, Bamberka, Rospuda i Rusałka niezależnie od traktowania, natomiast w przypadku pozostałych odmian reakcja roślin na poziomie ekspresji genu *SOD* była zróżnicowana w zależności od odmiany pszenicy i genotypu grzyba. Tymczasem nie badano odmian nieodpornych na choroby grzybowe, ale nie wykorzystano też patogenów grzybowych jako inokulum. Tymczasem badania Kunos i in [2022] wskazują, że w siewkach jęczmienia odmian podatnych na choroby grzybowe

zaobserwowano wyższy poziom ekspresji genu *SOD* niż w odmianach odpornych. Zbadano również wzorzec ekspresji genu *SOD2 w* jęczmieniu traktowanych *Pyrenophora teres* gdzie, stwierdzono, istotny wzrost ekspresji tego genu w 8 h po infekcji w genotypie opornym. Wzorzec ekspresji ulegał większym wahaniom u wrażliwych odmian [Pandey i in., 2021]. Podobne jak w niniejszej pracy, badania prowadzone z wykorzystaniem odmiany Bombona i Legenda wykazały również wpływ organu rośliny na poziom ekspresji genu *SOD* w danym przedziale czasowym po traktowaniu roślin szczepami *Trichoderma* [Basińska-Barczak, 2021], jednakże w niniejszej pracy do badań wykorzystano całą roślinę.

Kolejnym badanym w pracy genem był *PR9* [Desmond i in., 2006].Biorąc pod uwagę pszenicę jako gatunek, niezależnie od odmiany, stwierdzono spadek ekspresji genu *PR9* w siewkach pszenicy traktowanych grzybami. Tymczasem ekspresja genu *PR9* dla każdego traktowania była niższa w porównaniu do kontroli w roślinach odmian Bamberka, Euforia, Kandela i Ostroga, natomiast wzrost ekspresji tego genu dla każdego traktowania nastąpił w siewkach pszenicy odmian Arabella, Legenda oraz Rusałka. Różnice w ekspresji genu *PR9* odnotowano w przypadku odmiany Arkadia po traktowaniu *F. proliferatum* E202, w odmianie Bombona i Rospuda po traktowaniu *P. expansum* E193. Można zatem uznać, iż podobnie jak w przypadku wcześniej opisanych genów reakcja roślin na traktowanie badanymi gatunkami grzybów na poziomie genu *PR9* uwarunkowana była zarówno odmianą pszenicy jak i genotypem grzyba.

Badania Wu i in., [2014] dotyczące analizy różnych genów kodujących białka PR w pszenicy traktowanej *F. graminearum* udokumentowały brak znaczącej roli genu *PR9* w odpowiedzi roślin na infekcję grzybową. Natomiast Esmail i in. [2020] wykazali istotny wzrost ekspresji genu *PR9* w siewkach pszenicy odmian odpornych w 2 i 3 dniu po inokulacji *Puccinia striiformis F. sp. tritic*i. w porównaniu do roślin nieodpornych. Podobne obserwacje opisali Huang i in., [2013] w przypadku odmiany pszenicy Xingzi 9104 odpornej na rdzę paskowaną. Może to po raz kolejny sugerować wpływ odporności roślin i czasu trwania infekcji na reakcje pszenicy, co nie było analizowane w prezentowanej tutaj pracy doktorskiej. Dlatego też obserwowana specyficzność reakcji rośliny na traktowanie poszczególnymi szczepami grzybów otwiera drogę do dalszych badań nad interakcjami grzybów endofitycznych z pszenicą w różnych przedziałach czasowych. W przypadku traktowania mieszaniną grzybów należy wziąć pod uwagę, że między grzybami a rośliną zachodziły wielokierunkowe interakcje: roślina-grzyb, grzyb-grzyb. Stąd poznanie mechanizmu w jaki sposób społeczność mikroorganizmów wpływa wzajemnie na siebie w obrębie danej rośliny gospodarza, a także w jaki sposób genotyp rośliny modyfikuje te interakcje jest kluczowe przed podjęciem prac nad

selekcją mikroorganizmów w tym grzybów endofitycznych, możliwych do wykorzystania w biologicznej ochronie roślin.

6.8. Analiza współoddziaływań grzybów endofitycznych wyizolowanych z tkanek pszenicy

Interakcje między roślinami i drobnoustrojami oraz mikroorganizmami i mikroorganizmami są integralną częścią ekosystemu. Istnieje kilka rodzajów interakcji między grzybami: antybioza, konkurencja, i mykopasożytnictwo. w pracy doktorskiej analizowano oddziaływania wybranych szczepów grzybów wyizolowanych z enosfery pszenicy na podłożach laboratoryjnych. Do testów antagonistycznych w bikulturach wykorzystano następujące szczepy grzybów: *T. viride* E80, *T. koningii* E191, *T. hamatum* E81, *P. olsonii* E69_1, *P. expansum* E193, *P. crustosum* E106, *S. spinificis* E11, *S. strictum* E22, *F. proliferatum* E202, *P. album* E35, *C. candelabrum* E83, *N. golenkoana* E208. Selekcji tych grzybów dokonano na podstawie danych literaturowych, które wskazują, że *F. proliferatum* oraz *N. gorlenkoana* są patogenami wielu roślin uprawnych [Park i in., 2005, Wang i in., 2017], Grzyby z rodzaju *Trichoderma* mają potwierdzone działanie antagonistyczne wobec patogenów pszenicy, tj. P. *tritici, A. alternata, B. sorokiniana, R. solani, Fusarium sp.* [Brunner i in., 2005; Rojo i in., 2007, El-Sharkawy i in., 2018], grzyby z rodzaju *Clonostachys* hamują wzrost grzybów z rodzaju *Fusarium,* badania skupiły się jedynie na *C. rosea* [Jensen i in.2000], *S. strictum* hamują wzrost *F. graminearum* oraz *F. oxysporum* [Grunewaldt-Stöcker i von Alten, 2003; Rojas i in., 2020], *P. olsonii* hamują wzrost *F. graminearum* [Rojas i in., 2020], Brak jest natomiast dostatecznej wiedzy o *S. spinificis*, *P. crustosum*, *P. expansum* i *P. album*

W pracy wykazano, że wszystkie badane szczepy grzybów stymulowały wzrost szczepów grzybów z rodzaju *Penicillium*: *P. olsonii* E69_1, *P. expansum* E193 oraz *P. crustosum* E106 w 5 dniu koinkubacji. Natomiast wpływ szczepów *Penicillium sp.* na badane szczepy był negatywny i wyrażał się zahamowaniem ich wzrostu. Wyjątek stanowił szczep *P. expansum* E193, który w niewielkim stopniu stymulował wzrost *C. candelabrum* E83. Tymczasem wszystkie badane szczepy grzybów hamowały wzrost szczepów grzybów z rodzaju *Trichoderma*: *T. viride* E80, *T. koningii* E191, *T. hamatum* E81 w 5 dniu koinkubacji. Wyjątek stanowiły szczepy *S. strictum* E22 i *C. candelabrum* E83, które stymulowały wzrost *T. viride* E80. Analizując jednak wpływ szczepów z rodzaju *Trichoderma* na badane gatunki grzybów zaobserwowano, że stymulują wzrost szczepów grzybów *P. olsonii* E69_1, *P. expansum* E193, *P. crustosum* E106, *S. strictum* E22 i *S. spinificis* E11 oraz *P. album* E35, a hamują wzrost grzybni *F. proliferatum* E202, *C candelabrum* E83 i *N. gorlenkoana* E208.

Bardziej zróżnicowany wpływ badanych grzybów odnotowano w *P. album* E35. Wzrost grzybni *P. album* E35 odnotowano podczas jego interakcji z T. *viride* E80, T. *koningii* E191, *T. hamatum* E81 oraz *C. candelabrum* E83, *N. gorlenkoana* E208, *F. proliferatum* E202 i *S. spinificis* E11. Natomiast grzyby z rodzaju *Penicillium*: *P. olsonii* E69_1, *P. expansum* E193, *P. crustosum* E106 i *S. strictum* E22 działały antagonistycznie na szczep *P. album* E35. Analizując jednak wpływ *P. album* E35 na badane gatunki grzybów okazało się, że hamuje on wzrost T. *viride* E80, T. *koningii* E191, *T. hamatum* E81 oraz *C. candelabrum* E83, *N. gorlenkoana* E208 i *F. proliferatum* E202, a stymuluje wzrost: *P. olsonii* E69_1, *P. expansum* E193, *P. crustosum* E106, *S. strictum* E22 i *S. spinificis* E11. w przypadku wolnorosnącego gatunku *C. candelabrum* E83 większość gatunków hamowało jego wzrost. Wyjątek stanowił *P. expansum* E193 oraz *F. proliferatum* E202, które stymulowały wzrost *C. candelabrum* E83. Co ciekawe, *C. candelabrum* działał antagonistycznie względem wszystkich gatunków *Sarocladium*: oraz T. *koningii* E191, T. *hamatum* E81, *N. gorlenkoana* E208, a stymulował wzrost wszystkich gatunków *Penicillium*: *P. olsonii* E69_1, *P. crustosum* E106 oraz T. *viride* E80, *P. album* E35 i *F. proliferatum* E202. Warto wspomnieć, iż wolnorosnące gatunki *Clonostachys* charakteryzują się wysokim stopniem antagonizmu względem patogenów roślin, dzięki antybiozie, uwarunkowanej bogatym profilem metabolicznym [Han i in., 2020]. Stymulujący wpływ na wzrost gatunków *Sarocladium* miały grzyby z rodzaju *Trichoderma*: *T. viride* E80, *T. koningii* E191, *T. hamatum* E81 oraz *P. album* E35, *N. gorlenkoana* E208 i *F. proliferatum* E202, a także stymulowały siebie nawzajem. Natomiast szczepy grzybów rodzaju *Penicillium* oraz *C. candelabrum* E83 hamowały wzrost grzybni obu gatunków *Sarocladium*: *S. strictum* E22 i *S. spinificis* E11. Wpływ szczepów *Sarocladium sp*. na wzrost badanych grzybów był jednak bardziej zróżnicowany.

Przeprowadzone badania wykazały, że wszystkie gatunki grzybów działały hamująco na wzrost grzybni *N. gorlenkoana* E208. Pomimo tego zaobserwowano, że hamuje on wzrost grzybni *Trichoderma sp*., *F. proliferatum* E202 i *C. candelabrum* E83, a stymuluje wzrost grzybów z rodzaju *Penicillium* i *Sarocladium*: oraz *P. album* E35. Jak dotąd nie analizowano oddziaływań wymienionych powyżej gatunków grzybów wyizolowanych z endosfery pszenicy na podstawie testów w bikulturach. Przeprowadzone w niniejszej pracy doktorskiej badania wskazują jednak, iż charakter tych oddziaływań zdeterminowany jest gatunkiem/szczepem grzyba i jego specyfiką w odniesieniu do tempa wzrostu i prawdopodobnie zdolności metabolicznych (dane własne, nieopublikowane). Natomiast prowadzono wcześniej badania nad potencjałem antagonistycznym gatunków *Trichoderma* wobec *F. avenaceum, F. cerealis,*

F. culmorum, F. graminearum, F. temperatum, F. solani, R. solani [Błaszczyk i i in., 2017; Anees i in., 2010]. Podobnie, w niniejszej pracy wszystkie gatunki *Trichoderma* najefektywniej hamowały wzrost grzybni *F. proliferatum* E202. Inhibicje grzybni *F. proliferatum* E202 odnotowano również w ich kokulturze z gatunkami *Penicillium,* co znajduje odzwierciedlenie w badaniach [Rojas i in., 2020], gdzie udokumentowano antagonistyczny wpływ *P. olsonii* na *F. graminearum*. Również szczepy *P. album* E35 oraz *N. gorlenkoana* E208 hamowały wzrost grzybni *F. proliferatum* E202. Odwrotne zjawisko zaobserwowano w przypadku grzybów z rodzaju *Sarocladium* oraz *C. candelabrum E83* stymulowały wzrost grzybni *F. proliferatum*. Dostępne dane literaturowe opisują tymczasem antagonistyczny wpływ *S. strictum* na grzyby z rodzaju *Fusarium* [Rojas i in., 2020; Grunewaldt-Stocker i Alten, 2003]. W obecnej pracy obecność *F. proliferatum* E202 w bikulturze wywołała zahamowanie wzrostu grzybów z rodzaju *Trichoderma* oraz *N. gorlenkoana* E208, a stymulację wzrostu grzybów z rodzaju *Penicillium* i *Sarocladium* oraz *P. album* E35 i *C. candelabrum* E83.

Rozważając dany szczep jako potencjalny czynnik kontroli biologicznej należy wziąć pod uwagę obustronne oddziaływania zarówno selekcjonowanego szczepu względem patogenu i odwrotnie. Analizując wyniki prezentowanej pracy zaobserwowano antagonistyczny wpływ szczepów z rodzaju *Trichoderma* na szczepy *F proliferatum* E202 oraz *N. gorlenkoana* E208 uznane w literaturze za patogeny wielu roślin uprawnych [Park i in., 2005, Wang i in., 2016]. Jednakże obecność tych patogenów w bikulturze również wpływała negatywnie na wzrost szczepów *Trichoderma*. Zrozumienie czynników warunkujących te oddziaływania wymagałoby przeprowadzenia dalszych badań, np.: metabolicznych. Jednakże z przeprowadzonych badań wynika, iż selekcja szczepów antagonistycznych jako potencjalnych czynników kontroli biologicznej wymaga nie tylko zbadania ich oddziaływań względem istniejących patogenów, ale również względem innych mikroorganizmów, które mogą być jako konsorcjum wykorzystane w ochronie roślin lub być związane z tkankami pszenicy. Uzyskane wyniki świadczą, iż interakcje te są niezwykle zróżnicowane i prawdopodobnie uwarunkowane szeregiem różnych czynników zarówno związanych z genotypem grzyba jak i czynnikami zewnętrznymi (rodzaj podłoża, warunki środowiskowe a kontrolowane, genotyp rośliny i in.).

6.9. Wykorzystanie endofitów jako potencjalnych czynników biokontroli

Choroby wywoływane przez patogeny grzybowe ograniczają produkcję pszenicy, a w konsekwencji powodują znaczną redukcję plonów [Fradin i Thomma 2006]. Kontrola ich wzrostu zachodzi poprzez stosowanie fungicydów, które są jednocześnie szkodliwe dla

środowiska i człowieka [Soares i Porto, 2009]. Co więcej, coraz częściej obserwuje się występowanie szczepów opornych na fungicydy [Lucas i in., 2015]. Dlatego też poszukuje się nowych rozwiązań, możliwych do wykorzystania przy zarządzaniu chorobami pszenicy. Wśród nich wysoki potencjał posiadają tzw. czynniki kontroli biologicznej jak na przykład korzystne dla roślin gatunki grzybów, w tym endofity. Mikroorganizmy te mogą chronić roślinę poprzez zwiększenie odporności lub tolerancji na stresy biotyczne i abiotyczne lub poprzez bezpośrednie działanie antagonistyczne wobec patogenów. Zwiększenie odporności lub tolerancji roślin można osiągnąć, gdy mikroorganizmy zmieniają biochemię roślin [Thomma i in., 2001; Caplan i in., 2008]. Rozpoznawanie przez rośliny niepatogennych mikroorganizmów aktywuje kaskady sygnałowe, które ostatecznie prowadzą do zwiększonej odporności roślin. Tolerancja roślin jest często zwiększana przez aktywację działań antyoksydacyjnych podczas kolonizacji przez niepatogenne drobnoustroje [White i Torres, 2010]. Nie prowadzi to do zmniejszenia infekcji patogenami, ale ogranicza rozwój objawów. Bezpośredni antagonizm obejmuje różne mechanizmy, w tym współzawodnictwo, pasożytnictwo oraz sekrecję metabolitów wtórnych o działaniu antybiotycznym [Heydari i Pessarakli, 2010].

Wśród grzybów endofitycznych zidentyfikowanych w pracy zaobserwowano dużą grupę mikroorganizmów, które mają udokumentowany w literaturze pozytywny wpływ na roślinę gospodarza, a należą do nich takie gatunki jak: *Acremonium sp., A. flocullosa, A. lecanii, A. pullulans, P. olsonii, S. strictum, T. atroviride, T. asperellum, T. hamatum, T. harzianum, T. koningii, Chaetomium sp., Clonostachys sp., Cadophora sp., P. album*. Badania Dingle i McGee [2003] nad endofitami wykazały, że szczepy grzybów z rodzaju *Chaetomium* uzyskane ze zdrowych liści pszenicy przyczyniły się do zmniejszenia rozwoju rdzy wywoływanej przez *P. recondite f. sp. tritici*. Grzyby z rodzaju *Trichoderma* znane są powszechnie jako czynniki kontroli takich patogenów pszenicy jak *B. sorokiniana*, *R. solani*, czy grzyby z rodzaju *Fusarium*: *F. graminearum* i *F. oxysporum* [Brunner i in, 2005; (Rojo i in., 2007]. Szczep *T. atroviride* HB 20111 wykorzystano do zmniejszenia występowania chorób pszenicy wywoływanych przez *F. graminearum* [Sui i in., 2022]. Szczep *T. hamatum* wykazuje działanie antagonistyczne wobec *P. tritici-repentis* wywołującego rdzę brunatną plamistość pszenicy [Larran i in., 2016]. *Trichoderma koningii* zastosowano w zwalczaniu chorób pszenicy wywoływanych przez grzyby *P. tritici-repentis* i *Mycosphaerella graminicola* [Perello i in., 2006] oraz *B. sorokiniana* i *A. alternata* [Mónaco i in., 2004]. Gatunki tych grzybów znane są również jako potencjalne czynniki kontroli biologicznej patogenów innych

roślin uprawnych. *Trichoderma asperellum* wykorzystano do ochrony upraw ryżu [Santos de França i in., 2015] i pomidora [Kuzmanovska i in., 2018], a szczep *T. viride* HL5 opisano jako potencjalny czynnik kontroli rdzy zbożowej [(El-Sharkawy, Rashad i Ibrahim, 2018)]. Szczep T-22 *T. harzianum* użyto do ochrony upraw pomidora przed infekcją wirusa mozaiki ogórka CMV (ang. *Cucumber Mosaic Virus*) [Vitti i in., 2015] oraz przed infekcją *B. cinerea* [Kuzmanovska i in., 2018], szczep HL1 *T. harzianum* został zaklasyfikowany jako biologiczny czynnik kontroli rdzy zbożowej wywoływanej przez grzyby z rodzaju *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* [Perello i in., 2006; El-Sharkawy i in., 2018]. *Anthracocystis floculossa* i *P. olsonii* zostały udokumentowane jako potencjalne czynniki biokontroli fuzariozy kłosów [Rojas i in., 2020]. Ponadto grzyby endofityczne *P. olsonii* i *A. alternata* zidentyfikowano jako gatunki kontrolujące występowanie *Zymoseptoria tritici* wywołującego rdzę brunatną u pszenicy [Latz i in. 2020]. *Sarocladium strictum*, choć w literaturze opisany jako patogen kukurydzy i truskawki [Tagne i in., 2002; Racedo i in., 2013], to według Rojas i in. [2020] ma zdolność do hamowania rozwoju fuzariozy kłosów. Natomiast Grunewaldt-Stocker i Alten [2003] zaobserwowali, że inokulacja roślin lnu oraz pomidora grzybami A. *strictum* (=*S. strictum*) zmniejszała objawy infekcji *F. oxysporum*. *Sarocladium strictum* ograniczał również wzrost *in vitro Helminthosporium solani* i zmniejszał populację *Meloidogyne incognita* [Goswami i in., 2008], a także hamował wzrost grzybów z rodzaju *Botrytis* w pomidorach [Gyung i in., 2009]. Grzyby z rodzaju *Clonostachys*, *Penicillium* i *Acremonium* również identyfikowano jako potencjalne czynniki biokontroli chorób pszenicy takich jak fusarioza kłosów czy plamistość liści [Hue i in., 2009, Latz i in., 2020; Rojas i in., 2020a]. Jensen i in. [2016] wykazali antagonistyczny stosunek *E. nigrum* wyizolowanego z ziaren pszenicy wobec *F. graminearum w* testach *in vitro*. *Epicoccum nigrum* wykazywał również antagonistyczne działanie wobec *Sclerotinia sclerotiorum* w słoneczniku [Pieckenstain i in., 2001], *Pythium* w bawełnie [Hashem i Ali, 2004] i *Monilinia spp*. w brzoskwiniach i nektarynach [De Cal i in., 2009; Larena i Melgarejo, 2009]. W badaniach Wachowska i in. [2013] wykazano, że drożdże *A. pullulans* hamowały wzrost *F. avenaceum, F. culmorum* i *F. poae* w ziarnach pszenicy. Potwierdzono również w literaturze ich skuteczne działanie przeciw *Botrytis cinerea* [Lima i in., 1997, Schena i in., 1999], *P. expansum* [Bencheqroun i in., 2007; Zhang i in., 2010], jak również przeciwko *Rhizopus stolonifer* [Lima i in., 1997]. Wykazano też, że w warunkach *in vitro A. pullulans* powodował zmniejszenie siły kiełkowania zarodników grzybów z rodzaju *Penicillium* czy *Alternaria* [Kapoor i Karnwal, 2021].

W przedstawianej pracy zidentyfikowano również gatunki grzybów, których wpływ na pszenicę pozostaje nieznany, jednakże w literaturze opisywane są jako czynniki biologiczne wzmacniające odporność roślin na choroby wywoływane przez szkodniki czy zwiększające tolerancję roślin na stresy abiotyczne [Grunewaldt-Stocker i Alten, 2003; Yao i in., 2015]. Udokumentowano, że grzyby z rodzaju *Acremonium*, wyizolowane z wieloletnich traw wzmacniały odporność roślin na owady [Breen, 1994]. Grzyby z rodzaju *Acremonium* wyizolowane z kukurydzy zwiększały odporność na patogeny takie jak: *Pythium ultimum, Sclerotium oryzae, R. solani* i *Pyricularia oryzae* [Potshangbam i in., 2017]. Grzyby z rodzaju *Cadophora*, chroniły sadzonki melona przed *Fusarium oxysporum F. sp. melonis* w pożywkach zasilanych organicznym źródłem azotu [Khastini i in., 2014]. W literaturze wykazano ochronne działanie A. *lecanii* (syn. *L. lecanii*) przeciwko mszycom gorczycowym u A. *taliana* [Lin i in., 2016] oraz przędziorkom chmielowcowym w roślinach fasoli [Dash i in., 2018]. Wykazano również *in vitro* antagonistyczny charakter *A. lecanii* wobec *Sclerotinia sclerotiorum, R. solani* i *Aspergillus flavus* [Dolatabad i in. 2017]. Podwójnie antagonistyczne działanie, przeciw insektom oraz grzybom patogenicznym, stwarza możliwość wykorzystania ich w biologicznej ochronie roślin. Takie działanie zostało już potwierdzone w uprawie kawy, gdzie *A. lecanii* zmniejszał liczebność *Hemileia vastatrix* oraz *Coccus viridis* [Jackson i in., 2012]. *Anthracocystis flocculosa* został opisany jako epifit lub saprofit roślinny [Avis i Bélanger, 2002]. Znany jest ze swojej zdolności do zmniejszania występowania *Blumeria graminis f.sp. hordei* w jęczmieniu [Laur i in., 2017]. *Parengyodontium album* z uwagi na produkcję chitynazy może być uznany za grzyb entomopatogenny [Leplat i in., 2020]. Wykazano, że *M. bolleyi* ma zdolność supresji różnych patogenów roślinnych zbóż, takich jak *G. graminis var. tritici* [Fatemi i in., 2018] i *B. sorokiniana* [Duczek, 1997]. Grzyb ten hamował wzrost *F. culmorum* o 24,5–33% w bikulturach *in vitro*, a objawy chorobowe na kłosach wywołane przez *F. graminearum* były niższe do 54% w przypadku traktowania *M. bolleyi* [Comby i in., 2017]. Natomiast *Simplicillium chinense* może być wykorzystany jako biologiczny czynnik kontroli roślinnych nicieni pasożytniczych [Zhao i in. 2013; Luyen, 2017]. Bogactwo gatunkowe grzybów wyizolowanych z endosfery roślin pszenicy oraz ich charakterystyka i poznanie sposobu oddziaływań względem rośliny oraz innych mikroorganizmów bytujących w tym samym środowisku, zasocjowanych z rośliną stanowi podstawę do zidentyfikowania pożytecznych gatunków grzybów możliwych do wykorzystania w biologicznej ochronie roślin oraz jako biostymulatory ich wzrostu. Stąd wyizolowane i skolekcjonowane w niniejszej pracy doktorskiej szczepy grzybów stanowią cenne źródło do

dalszych badań i prac nad opracowaniem pożytecznych, efektywnych i nowoczesnych środków ochrony roślin umożliwiających lepsze zarządzanie chorobami pszenicy.

VII Podsumowanie

W pracy doktorskiej wykonano 4 doświadczenia ściśle ze sobą powiązane. W wyniku badań wyizolowano z endosfery polskich odmian pszenicy zwyczajnej 879 izolatów grzybów, z czego molekularnie zidentyfikowano 828, a na poziomie gatunku 521. W endosferze pszenicy wzrastającej w warunkach kontrolowanych (generacja G1 i G2) i polowych zidentyfikowano 85 następujących rodzajów/gatunków grzybów.

1. Doświadczenie nr 1

Celem Doświadczenia nr 1 było określenie różnorodności i zmian w składzie społeczności grzybów wyizolowanych z endosfery roślin, uwarunkowanych odmianą pszenicy, organem roślinnym i warunkami wzrostu. Zidentyfikowano 28 gatunków lub rodzajów grzybów endofitycznych wyizolowanych z roślin uprawianych w warunkach szklarniowych, 35 gatunków lub rodzajów endofitów wyizolowanych z roślin rosnących na polu, uprawianych w systemie ekologicznym oraz 52 gatunki/rodzaje grzybów wyizolowanych z roślin uprawianych w systemie tradycyjnym. Potwierdziły to uzyskane wartości wskaźników bioróżnorodności: Indeksu Shannona (H), wskaźnika Margalefa (MRI) oraz wskaźniku Menhinick'a (d). Ich najwyższe wartości zaobserwowano w uprawie polowej systemem tradycyjnym, odpowiednio: H=2,90; MRI=5,60; d=3,70. Natomiast najniższe wartości obserwowano w warunkach szklarniowych, odpowiednio: H=2,20; MRI=3,50; d=2,30. Zaobserwowano, że grzyby z rodzaju *Sarocladium* i *Fusarium* oraz *P. chrysogenum* występują w roślinach uprawianych w każdym z badanych warunków uprawy, niezależnie od odmiany, przy czym *Sarocladium sp.* zaobserwowano w odmianie Kandela. We wszystkich badanych odmianach pszenic, bez rozróżniania na warunki wzrostu, zaobserwowano występowanie grzybów z rodzaju *Alternaria, Fusarium, Penicillium* oraz gatunki *E. pedicellatum, F. proliferatum*. W większości badanych odmian (≥8) zaobserwowano grzyby z rodzaju *Sarocladium*, w tym *S. spinificis, F. oxysporum, M. bolleyi, P. macrospinosa*.

We wszystkich organach roślinnych występują grzyby z rodzaju *Alternaria, Cladosporium, Fusarium* (*F. oxysporum, F. proliferatum*), *Penicillium* (*P. chrysogenum, P. olsonii*), *Sarocladium* (*S. spinificis, S. strictum*). Wyłącznie w organach nadziemnych zaobserwowano grzyby: *A. lekanii, A. alternata, A. infectoria, Anthracocystis sp*. (*A. flocculosa*), *Moesziomyces sp., P. crustosum, T. koningii*. Wyłącznie w korzeniach zaobserwowano grzyby: *A. betulicola Arthrinium sp. Backusella sp., B. sorokiniana, Chaetomium sp., Colletotrichum sp., E. nigrum, F. avenaceum, F. poae, F. redolens, I. farinosa, Lecanicillium sp., Neonectria sp.S. terrestris, P. eupyrena, P. pomorum, T. asperellum, T. atroviride, T. harzianum, W. circinata*.

Dokonano również porównania struktury społeczności grzybów dla każdego organu roślinnego i każdego systemu uprawy (warunki kontrolowane, warunki polowe: uprawa ekologiczna i tradycyjna). W roślinach uprawianych w szkalrni oraz w warunkach polowych w obu systemach uprawych (uprawa tradycyjna i ekologiczna) zaobserwowano w korzeniach roślin grzyby z rodzaju *Fusarium,* w ziarniakach i łodydze grzyby z rodzaju *Sarocladium*, w łodydze *Alternaria sp.,* a w ziarniakach *Penicillium sp.* i *Cladosporium sp.*

2. Doświadczenie nr 2

Doświadczenie nr 2 polegało na wykonaniu testów antagonistycznych w bikulturach, wykorzystując następujące szczepy grzybów: *T. viride* E80, *T. koningii* E191, *T. hamatum* E81, *P. olsonii* E69_1, *P. expansum* E193, *P. crustosum* E106, *S. spinificis* E11, *S. strictum* E22, *F. proliferatum* E202, *P. album* E35, *C. candelabrum* E83, *N. golenkoana* E208. Obliczono procent zahamowania wzrostu dla wszystkich badanych szczepów w 5 dniu koinkubacji. Analizując te dane zaobserwowano, że wszystkie badane szczepy grzybów stymulowały wzrost szczepów z rodzaju *Penicillium*: *P. olsonii* E69_1, *P. expansum* E193 oraz *P. crustosum* E106. Natomiast wpływ szczepów *Penicillium sp.* na pozostałe szczepy był negatywny i wyrażał się zahamowaniem ich wzrostu. Wyjątek stanowił szczep *P. expansum* E193, który w niewielkim stopniu stymulował wzrost *C. candelabrum* E83. Tymczasem wszystkie badane szczepy grzybów hamowały wzrost grzybów z rodzaju *Trichoderma*: *T. viride* E80, *T. koningii* E191, *T. hamatum* E81. Wyjątek stanowiły tu szczepy *S. strictum* E22 i *C. candelabrum* E83, które stymulowały wzrost T. *viride* E80. Analizując jednak wpływ szczepów z rodzaju *Trichoderma* na badane gatunki grzybów zaobserwowano, że stymulują wzrost szczepów *P. olsonii* E69_1, *P. expansum* E193, *P. crustosum* E106, *S. strictum* E22 i *S. spinificis* E11 oraz *P. album* E35, a hamują wzrost grzybni *F. proliferatum* E202, *C candelabrum* E83 i *N. gorlenkoana* E208.

Bardziej zróżnicowany wpływ badanych grzybów odnotowano dla *P. album* E35. Wzrost grzybni *P. album* E35 odnotowano podczas jego interakcji z *T. viride* E80, *T. koningii* E191, *T. hamatum* E81 oraz *C. candelabrum* E83, *N. gorlenkoana* E208, *F. proliferatum* E202 i *S. spinificis* E11. Natomiast grzyby z rodzaju *Penicillium*: *P. olsonii* E69_1, *P. expansum* E193, *P. crustosum* E106 i *S. strictum* E22 działały antagonistycznie na szczep *P. album* E35. Analizując jednak wpływ *P. album* E35 na badane gatunki grzybów okazało się, że hamuje on wzrost T. *viride* E80, T. *koningii* E191, *T. hamatum* E81 oraz *C. candelabrum* E83, *N. gorlenkoana* E208 i *F. proliferatum* E202, a stymuluje wzrost: *P. olsonii* E69_1, *P. expansum* E193, *P. crustosum* E106, *S. strictum* E22 i *S. spinificis* E11. W przypadku wolnorosnącego

gatunku *C. candelabrum* E83 większość szczepów hamowało jego wzrost. Wyjątek stanowił *P. expansum* E193 oraz *F. proliferatum* E202, które stymulowały wzrost *C. candelabrum* E83. Co ciekawe, *C. candelabrum* działał antagonistycznie względem wszystkich gatunków *Sarocladium* oraz T. *koningii* E191, T. *hamatum* E81, *N. gorlenkoana* E208, a stymulował wzrost wszystkich gatunków *Penicillium*: *P. olsonii* E69_1, *P. crustosum* E106 oraz T. *viride* E80, *P. album* E35 i *F. proliferatum* E202. Stymulujący wpływ na wzrost gatunków *Sarocladium* miały grzyby z rodzaju *Trichoderma*: T. *viride* E80, T. *koningii* E191, *T. hamatum* E81 oraz *P. album* E35, *N. gorlenkoana* E208 i *F. proliferatum* E202, i działały synergistycznie względem siebie. Natomiast szczepy grzybów rodzaju *Penicillium* oraz *C. candelabrum* E83 hamowały wzrost grzybni obu gatunków *Sarocladium*: *S. strictum* E22 i *S. spinificis* E11. Wpływ szczepów *Sarocladium sp*. na wzrost badanych grzybów był jednak bardziej zróżnicowany. Przeprowadzone badania wykazały, że wszystkie gatunki grzybów hamowały wzrost grzybni *N. gorlenkoana* E208. Z drugiej strony *N. gorlenkoana* E208 hamował wzrost grzybni *Trichoderma sp., F. proliferatum* E202 i *C. candelabrum* E83, a stymulował wzrost grzybów z rodzaju *Penicillium* i *Sarocladium*: oraz *P. album* E35. Wszystkie gatunki *Trichoderma* najefektywniej hamowały wzrost grzybni *F. proliferatum* E202. Inhibicje grzybni *F. proliferatum* E202 odnotowano również w ich bikulturach z gatunkami *Penicillium.* Również szczepy *P. album* E35 oraz *N. gorlenkoana* E208 hamowały wzrost grzybni *F. proliferatum* E202. Odwrotne zjawisko zaobserwowano w przypadku grzybów z rodzaju *Sarocladium* oraz *C. candelabrum* E83, które stymulowały wzrost grzybni *F. proliferatum*. Obecność *F. proliferatum* E202 w bikulturze wywołała zahamowanie wzrostu grzybów z rodzaju *Trichoderma* oraz *N. gorlenkoana* E208, a stymulację wzrostu grzybów z rodzaju *Penicillium* i *Sarocladium* oraz *P. album* E35 i *C. candelabrum* E83.

3. Doświadczenie nr 3

Doświadczenie nr 3 polegało na analizie składu społeczności grzybów w dwóch generacjach roślin G1 i G2 wzrastających w warunkach szklarniowych, a także w aksenicznych siewkach pszenicy traktowanych wyselekcjonowanymi na podstawie wyników uzyskanych w Doświadczeniu nr 2 szczepami grzybów, mieszaniną tych grzybów oraz wodą sterylną jako kontrolą. W pokoleniu G2 wyizolowano i zidentyfikowano prawie 3-krotnie mniej izolatów niż w pokoleniu G1. Znalazło to też odzwierciedlenie w wartościach wskaźników bioróżnorodności, które były wyższe w pokoleniu G1. W pokoleniu G1 dominowały gatunki *S. spinificis* i *S. strictum*. Natomiast w pokoleniu G2 dominującym gatunkiem we wszystkich badanych odmianach pszenicy był *F. proliferatum.* Tylko 9 gatunków/rodzajów grzybów

endofitycznych było wspólnych dla obydwu pokoleń, a były to: *Fusarium sp., F. proliferatum, T. koningii, A. lecanii, Trichoderma sp., P. crustosum, T. hamatum, P. olsonii, Cladosporium sp.* Analiza porównawcza składu mykobiomu dwóch generacji roślin pszenicy G1 i G2 wykazała, że *F. proliferatum* występuje we wszystkich odmianach pszenicy ozimej i w obydwu badanych pokoleniach. Oprócz *F. proliferatum* w obydwu generacjach zaobserwowano występowanie *A. lecanii* w odmianie Legenda i *T. koningii* w odmianie Euforia. Natomiast grzyby z rodzaju *Trichoderma* zidentyfikowano w dwóch generacjach jedynie w pszenicy odmiany Bombona. Dodatkowo przeprowadzono porównanie składu mykobiomu w dwóch generacjach roślin z uwzględnieniem organów roślin. W korzenie, łodyga, liść i ziarniaki zaobserwowano obecność *F. proliferatum*. Wykazano, że korzenie wszystkich odmian były zasiedlone przez grzyby z rodzaju *Fusarium* i *Trichoderma*. Natomiast części nadziemne badanych odmian zasiedlały grzyby *P. crustosum* i *A. lecanii.*

Siedem dni po traktowaniu 14-dniowych siewek aksenicznych pszenicy wybranymi endofitami dokonano identyfikacji molekularnej re-izolowanych szczepów grzybów. W tym celu przeprowadzono analizę porównawczą sekwencji nukleotydowych odpowiednich markerów filogenetycznych dla wyizolowanych grzybów z sekwencjami nukleotydowymi uzyskanymi wyjściowo po pierwotnej izolacji badanych endofitów z tkanek pszenicy. Analiza porównawcza sekwencji wykazała, że szczepy *F. proliferatum, P. olsonii, P. expansum* i *T. hamatum* były zdolne do ponownego zasiedlenia tkanek badanych odmian pszenicy. *Fusarium proliferatum* nie wykryto jedynie w odmianach Bombona i Ostroga; *P. expansum* nie wykryto jedynie w odmianie Bamberka, a *T. hamatum* nie zidentyfikowano jedynie w odmianach Bombona, Kandela i Rospuda. *Penicillium olsonii* zasiedlił tkanki wszystkich badanych odmian. W wariantach traktowanych mieszaniną gatunków grzybów endofitycznych *P. expansum* oraz *F. proliferatum* były tymi, które ponownie skolonizowały tkanki roślinne. *Trichoderma hamatum* wyizolowano ponownie z tkanek odmiany Kandela. Natomiast w odmianie Rospuda oprócz *P. expansum* wyizolowano również *P. olsonii*. W przypadku szczepów *E. album, S. spinificis, C. candelabrum* i *N. gorlenkoana* nie zaobserwowano obecności tych grzybów w tkankach żadnej z badanych odmian pszenicy z wyjątkiem odmiany Bombona, w której wykryto szczep *N. gorlenkoana*.

4. Doświadczenie nr 4

Doświadczenie nr 4 miało na celu analizę ekspresji wybranych genów pszenicy po 7 dniach od traktowania roślin zawiesiną *F. proliferatum, P. olsonii, P. expansum, T. hamatum* oraz

mieszaniną tych grzybów. Wyniki badań przedstawionych w pracy wskazują na ograniczoną ekspresję genu *HSP70* po traktowaniu *F. proliferatum* E202, *P. olsonii* E69_1 oraz mieszaniną grzybów w 7 dniu po inokulacji. Natomiast po traktowaniu *P. expansum* E193 i T. *hamatum* E81w 7 dniu po inokulacji zaobserwowano nadekspresję genu *HSP70*. Analizując ekspresję genu *HSP70* zaobserwowano spadek jego ekspresji w siewkach odmiany Arabella, Arkadia, Bamberka Bombona, Ostroga, Rospuda i Rusałka po traktowaniu *F. proliferatum* E202. Tymczasem inokulacja *F. proliferatum* E202 wywołała nadekspresję genu *HSP70* w siewkach pszenicy odmiany Euforia, Kandela i Legenda. Po traktowaniu siewek pszenicy odmiany Arabella, Arkadia, Euforia, Ostroga, Rospuda i Rusałka *P. olsonii* E69_1 odnotowano spadek ekspresji genu *HSP70*, natomiast w siewkach odmian Bamberka, Bombona i Kandela zaobserwowano wzrost ekspresji badanego genu, a w siewkach odmiany Legenda nie zaobserwowano różnic między roślinami traktowanymi a roślinami kontrolnymi. Po traktowaniu siewek pszenicy odmiany Arabella, Arkadia, Bamberka Bombona, Euforia, Ostroga i Rusałka mieszaniną grzybów zaobserwowano spadek ekspresji genu *HSP70*, natomiast w odmianie Kandela i Legenda zaobserwowano nadekspresję tego genu. W siewkach odmiany Rospuda nie zaobserwowano różnic między roślinami traktowanymi a kontrolnymi. Szczep *P. expansum* E193 w siewkach odmian Arabella, Bombona, Ostroga, Rospuda i Rusałka wpłynął na obniżenie poziomu ekspresji genu *HSP70* w porównaniu do roślin kontrolnych. Natomiast w siewkach odmian Arkadia, Bamberka, Euforia, Kandela i Legenda po traktowaniu *P. expansum* E193 poziom ekspresji był wyższy. *Trichoderma hamatum* E81 w siewkach pszenicy wywołał spadek ekspresji genu *HSP70* u odmiany Arabella, Bamberka, Ostroga i Rusałka i jego wzrost w siewkach odmian Arkadia, Bombona, Euforia, Kandela, Legenda i Rospuda. Dane te wskazują, że niezależnie od szczepu/gatunku grzyba traktowanie roślin odmian Arabella, Ostroga i Rusałka wywołało spadek ekspresji genu *HSP70*. Natomiast w siewkach odmiany Kandela niezależnie od traktowania ekspresja genu *HSP70* była podwyższona. W siewkach odmiany Bombona i Kandela po traktowaniu *P. olsonii* E69_1 wykazano zarówno nadekspresję genu *HSP70* jak i *SOD* (dymutaza ponadtlenkowa). Podobną zależność zaobserwowano w siewkach pszenicy Kandela i Legenda po traktowaniu *F. proliferatum* E202, *P. expansum* E193 oraz *T. hamatum* E81.

Ekspresja genu *SOD* w siewkach pszenicy po traktowaniu *F. proliferatum* E202, *P. olsonii* E69_1, *P. expansum* E193, T. *hamatum* E81 oraz mieszaniną grzybów była niższa w porównaniu do kontroli. Zaobserwowano obniżoną ekspresję genu *SOD* w większości badanych odmian pszenicy, jak np. Arkadia, Bamberka, Rospuda i Rusałka traktowanych *F. proliferatum* E202; w siewkach odmian Arabella, Arkadia, Bamberka, Bombona, Ostroga,

Rospuda i Rusałka traktowanych mieszaniną grzybów i odmianach Arabella, Arkadia, Bombona, Bamberka, Euforia, Rospuda i Rusałka traktowanych *T. hamatum* E83. Traktowanie roślin obydwoma gatunkami *Penicillium -P. expansum* E193 i *P. olsonii* E69_1 dało zbieżne wyniki ekspresji genu kodującego dysmutazę ponadtlenkową w przypadku takich odmian jak: Arabella, Arkadia, Bamberka, Rospuda i Rusałka, gdzie zaobserwowano obniżenie ekspresji tego genu, a w odmianach Kandela i Legenda, odnotowano wyższą ekspresję genu *SOD* niż w roślinach kontrolnych, natomiast u odmiany Euforia nie zaobserwowano różnic między traktowaniem a kontrolą. Różne wyniki uzyskano jedynie dla roślin odmiany Bombona i Ostroga. Niezależnie od traktowania spadek ekspresji genu *SOD* odnotowano w odmianach Arkadia, Bamberka, Rospuda i Rusałka. Biorąc pod uwagę pszenicę jako gatunek, niezależnie od odmiany, stwierdzono spadek ekspresji genu *PR9* w siewkach pszenicy traktowanych grzybami. Tymczasem ekspresja genu *PR9* dla każdego traktowania była niższa w porównaniu do kontroli w roślinach odmian Bamberka, Euforia, Kandela i Ostroga, natomiast wzrost ekspresji tego genu dla każdego traktowania nastąpił w siewkach pszenicy odmiany Arabella, Legenda oraz Rusałka. Różnice w ekspresji genu *PR9* odnotowano w przypadku odmiany Arkadia po traktowaniu *F. proliferatum* E202 i w odmianie Bombona i Rospuda po traktowaniu *P. expansum* E193.

VIII Wnioski

1. Endosfera polskich odmian pszenicy jest źródłem wielu gatunków i rodzajów grzybów endofitycznych.
2. W tkankach wewnętrznych polskich odmian pszenicy występuje 85 gatunków lub rodzajów grzybów.
3. Gatunki grzybów tj: *A. betulicola, A. lecanii, A. flocculosa, Arthrinium sp., A. westerdijkiae, A. pullulans, Backusella sp., Cadophora sp., C. pseudomerdarium, C. candelabrum, Colletotrichum sp., D. pomorum, E. pedicellatum, Gibellulopsis sp., I. farinosa, L. leptobactrum, Meira sp., Meyerozyma sp., M. bolleyi, M. bullatus, Moesziomyces sp., Neonectria sp., N. gorlenkoana, P. album, P. amphipolaria, P. chrysogenum, P. crustosum, P. digitatum, P. expansum, P. olsonii, Penidiella sp., P. macrospinosa, Phlebia sp., P. pannorum, R. solani, S. spinificis, S. strictum, S. terrestris, S. bisbyi, S. chinense, T. aculeatus, T. asperellum, T. atroviride, T. hamatum, T. koningii, T. viride, Verticillium sp.* oraz *W. circinata* po raz pierwszy opisano jako endofity pszenicy.
4. Tkanki pszenicy są miejscem bytowania dla rzadkich rodzajów *Acremonium, Backusella, Cadophora, Colletotrichum, Gibellulopsis, Lecanicillium, Meira, Meyerozyma, Neonectria, Penidiella, Phlebia, Verticillium* i gatunków *A. conjuncta, A. westerdijkiae, C. allicinum, C. candelabrum, Ch. pseudomerdarium D. pomorum, F. temperatum, I. farinosa, L. leptobactrum, M. bullatus, P. amphipolaria, P. expansum, P. eupyrena, P. album, P. pannorum, R. solani, T. aculeatus,* które powszechnie występują w środowiskach leśnych, sadach, jak również miejscach mało dostępnych, jak kopalnie czy jaskinie czy miejsca sakralne i historyczne.
5. Bioróżnorodność gatunkowa grzybów endofitycznych zasiedlających endosferę badanych odmian pszenicy, wyrażona Indeksem Shannona, Indeksem Margalefa oraz Indeksem Menhinick'a zdeterminowana jest głównie warunkami uprawy roślin, a nie odmianą pszenicy.
6. Obserwowana niższa bioróżnorodność grzybów zasocjowanych z wewnętrznymi tkankami badanych odmian pszenic wzrastających w warunkach polowych, uprawianym systemem ekologicznym (33) w stosunku do roślin uprawianych systemem tradycyjnym (52 gat./rodzaje) najprawdopodobniej wynika z tego iż niestosowanie środków ochrony roślin w uprawie ekologicznej przyczyniło się do rozwoju grzybów szybko- i powszechnie występujących, w tym patogenicznych, które zdominowały badane siedlisko.

7. Grzyby z rodzaju *Sarocladium* i *Fusarium* oraz gatunek *P. chrysogenum* występują w roślinach uprawianych w każdym z badanych warunków uprawy, niezależnie od odmiany.
8. Grzyby z rodzaju *Alternaria, Fusarium*, *Penicillium,* oraz gatunki *E. pedicellatum* i *F. proliferatum* występujące we wszystkich badanych odmianach pszenicy, niezależnie od warunków uprawy i organu pszenicy.
9. Grzyby z rodzaju *Alternaria, Cladosporium, Fusarium* (*F. oxysporum, F. proliferatum*), *Penicillium* (*P. chrysogenum, P. olsonii*), *Sarocladium* (*S. spinificis, S. strictum*) zasiedlają wszystkie organy pszenicy niezależnie od warunków wzrostu i odmiany.
10. Grzyby z rodzaju *Alternaria* i *Penicillium* oraz *F. proliferatum* mogą stanowić tzw. *core microbiome* polskich odmian pszenicy.
11. *Akanthomyces lecanii A. alternata, A. infectoria,A. flocculosa, Moesziomyces sp., P. crustosum, T. koningii* zasocjowane są wyłącznie z organami nadziemnymi polskich odmian pszenicy, niezależnie od warunków wzrostu rośliny i odmiany pszenicy.
12. *A. betulicola, Arthrinium sp. Backusella sp., B. sorokiniana, Chaetomium sp., Colletotrichum sp., E. nigrum, F. avenaceum, F. poae, F. redolens, I. farinosa, Lecanicillium sp., Neonectria sp.S. terrestris, P. eupyrena, P. pomorum, T. asperellum, T. atroviride, T. harzianum, W. circinata* występują wyłącznie w korzeniach badanych odmian pszenic, niezależnie od warunków wzrostu i odmiany pszenicy.
13. W każdym systemie uprawy, niezależnie od odmiany, w korzeniach pszenicy występują grzyby z rodzaju *Fusarium*, w ziarniakach i łodydze grzyby z rodzaju *Sarocladium,* w łodydze *Alternaria sp.,* a w ziarniakach *Penicillium sp.* i *Cladosporium sp.*
14. Szczepy grzybów *T. viride* E80, *T. koningii* E191, *T. hamatum* E81, *S. spinificis* E11, *S. strictum* E22, *F. proliferatum* E202, *P. album* E35, *C. candelabrum* E83, *N. golenkoana* E208 wyizolowane z endosfery pszenicy stymulują wzrost grzybów z gatunku *Penicillium* w bikulturach na podłożu stałym agarowym.
15. Szczepy grzybów *P. olsonii* E69_1, *P. expansum* E193, *P. crustosum* E106, *S. spinificis* E11, *S. strictum* E22, *F. proliferatum* E202, *P. album* E35, *C. candelabrum* E83 działają antagonistycznie względem grzybów z rodzaju *Trichoderma* oraz *N. gorlenkoana* E208. Wyjątek stanowią *S. strictum* E22 i *C. candelabrum* E83, które stymulowały wzrost *T. viride* E80.
16. Najwyższy potencjał antagonistyczny względem *F. proliferatum E202* wykazują grzyby z rodzaju *Trichoderma* oraz *Penicillium*, jak również *P. album* E35 i *N.*

gorlenkoana E208. Są potencjalnym źródłem czynników kontroli biologicznej względem *F. proliferatum*.

17. Charakter oddziaływań grzybów endofitycznych wyizolowanych z roślin pszenicy określony na podstawie testów w bikulturach jest zdeterminowany gatunkiem/szczepem grzyba, w tym tempem jego wzrostu.
18. Grzyby z rodzaju *Fusarium*, w tym *F. proliferatum*, z rodzaju *Trichoderma*, w tym *T. koningii* i *T. hamatum* oraz *Penicilium* – P. crustosum i P. olsonii a także *Cladosporium sp.* oraz *A. lecanii* można uznać za zdolne do transmisji wertykalnej między pokoleniami roślin. Obecność tych grzybów zidentyfikowano bowiem w dwóch generacjach badanych odmian pszenicy.
19. *F. proliferatum* E202, *P. olsonii* E69_1, *P. expansum* i *T. hamatum* są zdolne do horyzontalnej transmisji i kolonizacji tkanek roślin pszenicy.
20. *Fusarium proliferatum* E202 jest zdolny zarówno do transmisji horyzontalnej jak i wertykalnej, w celu zasiedlenia tkanek roślinnych.
21. Wzrost kolejnego pokolenia roślin w sterylnych warunkach szklarniowych, ograniczający dostęp do warunków zewnętrznych, wpływa na obniżenie bioróżnorodności grzybów zasiedlających ich tkanki.
22. Ekspresja badanych genów (*SOD, PR9, HSP70*) zależy od genotypu rośliny/odmiany jak również gatunków grzybów, którymi rośliny były traktowane.
23. Traktowanie siewek pszenicy grzybami *P. olsonii, P. expansum* oraz T. *hamatum* wpływa na obniżenie ekspresji genu *PR9*.
24. Określenie mechanizmu molekularnego interakcji zachodzących pomiędzy mikroorganizmami a rośliną, oraz pomiędzy mikroorganizmami a mikroorganizmami w obrębie danej rośliny gospodarza oraz wpływu genotypu rośliny na te interakcje jest kluczowe przed podjęciem prac nad selekcją mikroorganizmów w tym grzybów endofitycznych pod kątem ich wykorzystania w biologicznej ochronie roślin lub jako czynników stymulujących wzrost i rozwój roślin.
25. Grzyby z rodzaju *Penicillium* wpływają na ekspresję genu kodującego peroksydazę (*PR9*) oraz białko szoku cieplnego (*HSP70*) w siewkach pszenicy, lecz efekt ten zależy od gatunku grzyba, jak i odmiany pszenicy.
26. Endosfera polskich odmian pszenicy jest źródłem gatunków grzybów, które potencjalnie mogą mieć pożyteczny wpływ na wzrost i rozwój roślin, a do których należą: *A. sclerotigenum, A. flocullosa, A. lecanii, A. pullulans, Ch. pseudomerdarium, M. bolleyi, P. olsonii, S. strictum, T. atroviride, T. asperellum, T. hamatum,*

T. harzianum, T. koningii, Talaromyces sp., Chaetomium sp., Clonostachys sp., Cadophora sp., P. album, S. chinense grzyby te mogą być wykorzystane w dalszych badaniach nad biologiczną ochroną roślin.

27. Wewnętrzne tkanki roślin pszenicy zasiedlane są przez gatunki grzybów powszechnie znane jako patogeny pszenicy lub innych roślin, np. *A. alternata, A. infectoria, Arthrinium sp., B. sorokiniana, Colletotrichum sp., F. avenaceum, F. poae, F. proliferatum, F. oxysporum, M. bullatus, Neonectria sp., N. gorlenkoana, P. digitatum, P. crustosum, P. expansum, P. macrospinosa, R. solani, S. terrestris, S. strictum, S. versicarium, Verticillium sp.*
28. tkanki polskich odmian pszenic są siedliskiem dla grzybów, tj: *P. album, P. pannorum, L. leptobactrum, C. cladosporoides,* których wpływ na rośliny pszenicy, jak i inne rośliny, jak dotąd nie został określony.
29. Na podstawie przeprowadzonych badań oraz danych literaturowych na temat gatunków grzybów wyizolowanych z dziesięciu odmian pszenicy wskazano, że wyizolowane i skolekcjonowane w niniejszej pracy doktorskiej szczepy grzybów stanowią cenne źródło do dalszych badań i prac nad opracowaniem pożytecznych, efektywnych i nowoczesnych środków ochrony roślin umożliwiających lepsze zarządzanie chorobami pszenicy.

IX Streszczenie

Mikroorganizmy, a w tym grzyby odgrywają ważną rolę w prawidłowym rozwoju i funkcjonowaniu rośliny. Choć interakcje te mogę wydawać się bezobjawowe, to obecność mikroorganizmów poprawia zdolności adaptacyjne rośliny do środowiska, w którym żyje i jego zmian. Grzyby pełnią istotną rolę w naturalnych ekosystemach. Te, które występują w wewnętrznych tkankach roślin, nie wywołując symptomów chorobowych określa się endofitami. Interakcje między grzybami endofitycznymi a rośliną gospodarzem są niezwykle złożone, a ich skutki zróżnicowane. Jednoznaczne określenie funkcji (komensalna, patogeniczna, symbiotyczna) endofitów w roślinie jest trudne, ponieważ ten sam gatunek grzybów, w zależności od warunków środowiskowych, może zmieniać swój styl życia i przejść z patogena do komensala czy odwrotnie. Zaobserwowano występowanie grzybów endofitycznych w tkankach pszenicy. Ich obecność wpływała na zmniejszenie podatności na stresy biotyczne i abiotyczne czy pozytywnie wpływała na wzrost i rozwój roślin. Obecna wiedza na temat grzybów endofitycznych w pszenicy opiera się na badaniach prowadzonych w wąskim zakresie warunków doświadczalnych, w tym genotypów pszenicy, organów roślinnych, stadium rozwoju rośliny czy warunków środowiskowych. Celem pracy doktorskiej było poznanie struktury i czynników determinujących skład gatunkowy grzybów zasiedlających endosferę pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) oraz zbadanie wpływu zmian zachodzących w mykobiomie endosfery pszenicy na ekspresję wybranych genów roślinnych.

W przedstawionej pracy badano dziesięć polskich odmian pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.): pięć formy jarej: Arabella, Bombona, Kandela, Rospuda i Rusałka i pięć formy ozimej: Arkadia, Bamberka, Euforia, Legenda i Ostroga. Wykonano cztery doświadczenia ściśle ze sobą powiązane. W wyniku badań wyizolowano z endosfery polskich odmian pszenicy zwyczajnej 879 izolatów grzybów, z czego molekularnie zidentyfikowano 828, a na poziomie gatunku 521. W endosferze pszenicy wzrastającej w warunkach kontrolowanych (generacja G1 i G2) i polowych zidentyfikowano 85 następujących rodzajów/gatunków grzybów. Celem Doświadczenia nr 1 było określenie różnorodności i zmian w składzie społeczności grzybów wyizolowanych z endosfery roślin, uwarunkowanych odmianą pszenicy, organem roślinnym i warunkami wzrostu. Zidentyfikowano 28 gatunków lub rodzajów grzybów endofitycznych wyizolowanych z roślin uprawianych w warunkach szklarniowych, 35 gatunków lub rodzajów endofitów wyizolowanych z roślin rosnących na polu, uprawianych w systemie ekologicznym oraz 52 gatunki/rodzaje grzybów wyizolowanych z roślin uprawianych w systemie

tradycyjnym. Doświadczenie nr 2 polegało na wykonaniu testów antagonistycznych w bikulturach, wykorzystując następujące szczepy grzybów: *T. viride* E80, *T. koningii* E191, *T. hamatum* E81, *P. olsonii* E69_1, *P. expansum* E193, *P. crustosum* E106, *S. spinificis* E11, *S. strictum* E22, *F. proliferatum* E202, *P. album* E35, *C. candelabrum* E83, *N. golenkoana* E208. Obliczono procent zahamowania wzrostu dla wszystkich badanych szczepów w 5 dniu koinkubacji. Analiza wyników wykazała wpływ badanych szczepów na siebie. Doświadczenie nr 3 polegało na analizie składu społeczności grzybów w dwóch generacjach roślin G1 i G2 wzrastających w warunkach szklarniowych, a także w aksenicznych siewkach pszenicy traktowanych wyselekcjonowanymi na podstawie wyników uzyskanych w Doświadczeniu nr 2 szczepami grzybów, mieszaniną tych grzybów oraz wodą sterylną jako kontrolą. W pokoleniu G2 wyizolowano i zidentyfikowano prawie 3-krotnie mniej izolatów niż w pokoleniu G1. Tylko 9 gatunków/rodzajów grzybów endofitycznych było wspólnych dla obydwu pokoleń, a były to: *Fusarium sp., F. proliferatum, T. koningii, A. lecanii, Trichoderma sp., P. crustosum, T. hamatum, P. olsonii, Cladosporium sp.* Analiza porównawcza składu mykobiomu dwóch generacji roślin pszenicy G1 i G2 wykazała, że *F. proliferatum* występuje we wszystkich odmianach pszenicy ozimej i w obydwu badanych pokoleniach. Oprócz *F. proliferatum* w obydwu generacjach zaobserwowano występowanie *A. lecanii* w odmianie Legenda i *T. koningii* w odmianie Euforia. Natomiast grzyby z rodzaju *Trichoderma* zidentyfikowano w dwóch generacjach jedynie w pszenicy odmiany Bombona. Siedem dni po traktowaniu 14-dniowych siewek aksenicznych pszenicy wybranymi endofitami dokonano identyfikacji molekularnej re-izolowanych szczepów grzybów. W tym celu przeprowadzono analizę porównawczą sekwencji nukleotydowych odpowiednich markerów filogenetycznych dla wyizolowanych grzybów z sekwencjami nukleotydowymi uzyskanymi wyjściowo po pierwotnej izolacji badanych endofitów z tkanek pszenicy. Analiza porównawcza sekwencji wykazała, że szczepy *F. proliferatum, P. olsonii, P. expansum* i *T. hamatum* były zdolne do ponownego zasiedlenia tkanek badanych odmian pszenicy. Doświadczenie nr 4 miało na celu analizę ekspresji wybranych genów pszenicy po 7 dniach od traktowania roślin zawiesiną *F. proliferatum* E202, *P. olsonii* E69_1, *P. expansum* E193, *T. hamatum* E81 oraz mieszaniną tych grzybów. Do analiz wybrano gen *HSP70* kodujący białko szoku cieplnego, *PR9* kodujący peroksydazę oraz *SOD* kodujący dysmutazę ponadtlenkową. Zaobserwowano, że ekspresja badanych genów (*SOD, PR9, HSP70*) zależy od genotypu rośliny/odmiany jak również gatunków grzybów, którymi rośliny były traktowane.

X Abstract

Microorganisms, including fungi, play an important role in the proper development and functioning of plants. Although these interactions may seem asymptomatic, the presence of microorganisms improves the adaptability of the plant to the environment in which it lives. Fungi play an important role in natural ecosystems. Endophytes occur in the internal tissues of plants without causing disease symptoms. Interactions between endophytic fungi and host plants are extremely complex and their effects vary. Unambiguous determination of the function (commensal, pathogenic, symbiotic) of endophytes in a plant is difficult because the same species of fungi, depending on environmental conditions, can change their lifestyle and go from pathogen to commensal or vice versa. Endophytic fungi were observed in wheat tissues. Their presence reduces susceptibility to biotic and abiotic stresses and positively influences the growth and development of plants. Current knowledge about endophytic fungi in wheat is based on research conducted under a narrow range of experimental conditions, including wheat genotypes, plant organs, plant development stage, and environmental conditions. This doctoral thesis aimed to learn the structure and factors determining the species composition of fungi inhabiting the endosphere of common wheat (*Triticum aestivum* L.) and to investigate the impact of changes in the mycobiome of the wheat endosphere on the expression of selected plant genes.

Ten Polish cultivars of common wheat (*Triticum aestivum* L.) were tested in the presented paper: five spring forms: Arabella, Bombona, Kandela, Rospuda, and Rusałka, and five winter forms: Arkadia, Bamberka, Euforia, Legenda and Ostroga. Four closely related experiments were performed. As a result of this research, 879 fungal isolates were isolated from the endosphere of Polish common wheat cultivars, of which 828 were identified molecularly and 521 were identified at the species level. The aim of Experiment No. 1 was to determine the diversity and changes in the composition of fungal communities isolated from the plant endosphere conditioned by wheat variety, plant organs, and growth conditions. 28 species or genera of endophytic fungi isolated from plants grown under greenhouse conditions, 35 species or genera of endophytes isolated from plants growing in the field and cultivated in an ecological system, and 52 species or genera endophytic fungi isolated from plants grown in a traditional system were identified. Experiment no. 2 consisted in performing antagonistic tests in bicultures, using the following fungal strains: *T. viride* E80, *T. koningii* E191, *T. hamatum* E81, *P. olsonii* E69_1, *P. expansum* E193, *P. crustosum* E106, *S. spinificis* E11, *S. strictum* E22, *F. proliferatum* E202, *P. album* E35, *C. candelabrum* E83, *N. golenkoana* E208. The percentage

of growth inhibition was calculated for all test strains on day five of co-incubation. The analysis of the results showed the influence of the tested strains on each other. Experiment No. 3 consisted of the analysis of the composition of the fungal community in two generations of G1 and G2 plants grown under greenhouse conditions, as well as in axenic wheat seedlings treated with fungal strains selected based on the results obtained in Experiment No. 2, with a mixture of these fungi and sterile water as a control. Almost 3 times fewer isolates were isolated and identified in the G2 generation than in the G1 generation. Only 9 species/genera of endophytic fungi were common to both generations: *Fusarium sp., F. proliferatum, T. koningii, A. lecanii, Trichoderma sp., P. crustosum, T. hamatum, P. olsonii, Cladosporium sp*. Comparative analysis of the mycobiome composition of two generations of G1 and G2 wheat plants showed that *F. proliferatum* occurs in all varieties of winter wheat and both generations studied. In addition to *F. proliferatum*, the occurrence of *A. lecanii* in the cultivar Legenda and *T. koningii* in the cultivar Euforia was observed in both generations. In contrast, *Trichoderma* fungi were identified in two generations of Bombona wheat. Seven days after treating 14-day-old wheat axenic seedlings with selected endophytes, molecular identification of the re-isolated fungal strains was performed. For this purpose, a comparative analysis of the nucleotide sequences of the appropriate phylogenetic markers for the isolated fungi was performed using the nucleotide sequences obtained initially after the primary isolation of the tested endophytes from wheat tissues. Comparative sequence analysis showed that the strains of *F. proliferatum*, *P. olsonii*, *P. expansum*, and *T. hamatum* were able to repopulate the tissues of the tested wheat cultivars. Experiment no. 4 was aimed at analyzing the expression of selected wheat genes 7 days after treatment of the plants with a suspension of *F. proliferatum* E202, *P. olsonii* E69_1, *P. expansum* E193, *T. hamatum* E81, and a mixture of these fungi. The *HSP70* gene encoding heat shock protein, *PR9* gene encoding peroxidase, and *SOD* gene encoding superoxide dismutase were selected for analysis. It was observed that the expression of the studied genes (*SOD, PR9, HSP70*) depended on the genotype of the plant/variety as well as the species of fungi with which the plants were treated.

XI Bibliografia

A'Hara, D. (2015). Detection and identification of *Phoma* pathogens of potato. *Methods Mol. Biol.; 1302*, strony 17-27.

Aamir, M., Kashyap, S., Zehra, A., Dubey, M., Singh, V., Ansari, W., . . . Singh, S. (2019). Trichoderma erinaceum Bio-Priming Modulates the WRKYs Defense Programming in Tomato Against the *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) Challenged Condition. *Front. Plant Sci.; 10*, str. 911.

Abd-Alla, M., El-Enany, A., Nafady, N., Khalaf, D. i Morsy, F. (2014). Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiol Res 169*, strony 49-58.

Abdelaziz, M., Abdelsattar, M., Abdeldaym, E., Atia, M., Mahmoud, A., Saad, M. i Hirt, H. (2019). *Piriformospora indica* Alters Na+/K+ Homeostasis, Antioxidant Enzymes and LeNHX1 Expression of Greenhouse Tomato Grown under Salt Stress. *Sci. Hortic.; 256*, str. 108532.

Abdul Malik, N., Kumar, I. i Nadarajah, K. (2020). Elicitor and Receptor Molecules: Orchestrators of Plant Defense and Immunity. *Int J Mol Sci.; 21(3)*, str. 963.

Abdullah, S. i Atroshi, H. (2014). New records of fungi on wheat grains from Iraq. *Journal of University of Zakho; 2A(2)*, strony 256-265.

Addy, H., Piercey, M. i Currah, R. (2005). Microfungal endophytes in roots. *Canadian Journal of Botany 83*, strony 1-13.

Adeleke, B., Ayilara, M. i Akinola, S. (2022). Biocontrol mechanisms of endophytic fungi. *Egypt J. Biol. Pest Control.; 32*, str. 46.

Adesemoye, A., Torbert, H. i Kloepper, J. (2009). Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol 58*, strony 921-929.

Afkhami, M. i Rudgers, J. (2008). Symbiosis lost: imperfect vertical transmission of fungal endophytes in grasses. *The American Naturalist 172*, strony 405-416.

Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q. i Steinberg, C. (2009). Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist, 184*, strony 529-544.

Al-Asbahi, A. (2012). Arbuscular mycorrhizal protein mRNA overexpression in bread wheat seedlings by *Trichoderma harzianum* Raifi (KRL-AG2) elicitation. *Gene, 494*, strony 209-213.

AL-Hussaini, I. i Rahaif, E. (2021). Detection the Gene that Responsible for the Production of OTA from *Aspergillus niger* and *Aspergillus ochraceus* in Wheat and Maize Grains. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology, 25(6)*, strony 12598–12610.

Ali, A., Abdelrahman, M., Radwan, U., El-Zayat, S. i El-Sayed, M. (2018). Effect of *Thermomyces* Fungal Endophyte Isolated from Extreme Hot Desert-Adapted Plant on Heat Stress Tolerance of Cucumber. *Appl. Soil Ecol.; 124*, strony 155-162.

Ali, S., Mir, Z., Tyagi, A., Bhat, J., Chandrashekar, N. i Papolu, P. (2017). Identification and comparative analysis of *Brassica juncea* pathogenesis-related genes in response to hormonal, biotic and abiotic stresses. *Acta Physiol. Plant 3*.

Alkan, M., Bayraktar, H., İmren, M., Özdemir, F., Lahlali, R., Mokrini, F., . . . Özer, G. (2022). Monitoring of Host Suitability and Defense-Related Genes in Wheat to *Bipolaris sorokiniana*. *J Fungi (Basel); 8(2),* str. 149.

Alkan, M., Özer, G., İmren, M., Özdemir, F., Morgounov, A. i Dababat, A. (2021). First Report of *Fusarium culmorum* and *Microdochium bolleyi* Causing Root Rot on Triticale in Kazakhstan. *Plant Dis.; 1*.

Al-Sadi, A. (2021). *Bipolaris sorokiniana*-induced black point, common root rot, and spot blotch diseases of wheat: A review. *Front. Cell. Infect. Microbiol.; 11*, str. 118.

Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. i Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology, 215(3)*, strony 403–410.

Alvindia, D. i de Guzman, M. (2016). Survey of Philippine coffee beans for the presence of ochratoxigenic fungi. *Mycotoxin Res., 32*, strony 61-67.

Ameya, M. i in., i. (brak daty). Priming of wheat with the green leaf volatile Z-3-hexenyl acetate enhances defense against *Fusarium graminearum* but boosts deoxynivalenol production. *Plant Physiol., 167*, strony 1671-1684.

Anand, R., Paul, L. i Chanway, C. (2006). Research on endophytic bacteria: recent advances with forest trees. W B. Schulz, C. Boyle i T. Sieber, *Microbial Root Endophytes* (strony 89-103). Berlin: Springer-Verlag.

Andersen, C., Jensen, J. i Orntoft, T. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research; 64* , strony 5245-5250.

Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L., Héraud, C. i Steinberg, C. (2010). Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biol.; 141*, strony 691–701.

Antle, J. i McGuckin, T. (1993). Technological innovations, agricultural productivity and environmental quality. W G. Carlson, D. Zilberman i J. Miranowski, *Agricultural and Environmental Resource Economics* (strony 175-220). New York: Oxford University Press, Inc.

Arif, I., Batool, M. i Schenk, P. (2020). Plant Microbiome Engineering: Expected Benefits for Improved Crop Growth and Resilience. *Trends Biotechnol 38* , strony 1385-1396.

Arnold, A. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews 21*, strony 51-66.

Arnold, A., Mejía, L., Kyllo, D., Rojas, E., Maynard, Z., Robbins, N. i Herre, E. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(26)*, strony 15649–15654.

Arora, H., Sharma, A., Poczai, P., Sharma, S., Haron, F. i Gafur, A. (2022). Plant-Derived protectants in combating soil-borne fungal infections in tomato and chilli. *J. Fungi. 8,*, str. jof8020213.

Ausubel, F. (2005). Are innate immune signalling pathways in plants and animals conserved? *Nat. Immunol. 6*, strony 973–979.

Avis, T. i Bélanger, R. (2002). Mechanisms and means of detection of biocontrol activity of *Pseudozyma* yeasts against plant-pathogenic fungi. *FEMS Yeast Res., 2*, strony 5-8.

Ayers, S., Zink, D., Mohn, K. i in., (2010). Anthelmintic constituents of *Clonostachys candelabrum*. *J Antibiot.; 63*, strony 119–122.

Backman, P. i Sikora, R. (2008). Endophytes: an emerging tool for biological control. *Biological Control 46*, strony 1-3.

Bakker, M., Chaparro, J., Manter, D. i Vivanco, J. (2015). Impacts of bulk soil microbial community structure on rhizosphere microbiomes of *Zea mays*. *Plant Soil 392*, strony 115-126.

Bakker, P., Berendsen, R., Van Pelt, J., Vismans, G., Yu, K. i Li, E. (2020). The Soil-Borne Identity and Microbiome-Assisted Agriculture: Looking Back to the Future. *Mol Plant 13*, strony 1394-1401.

Balasubramanian, N., Thamil Priya, V., Shanmugaiah, V. i in. (2014). Effect of improved *Trichoderma fusants* and their parent strains in control of sheath blight of rice and wilt of tomato. *J Plant Dis Prot.; 121*, strony 71–78.

Balmas, V., Scherm, B., Marcello, A., Beyer, M., Hoffmann, L., Migheli, Q. i Pasquali, M. (2015). *Fusarium* species and chemotypes associated with fusarium head blight and fusarium root rot on wheat in Sardinia. *Plant Pathol, 64*, strony 972-979.

Baltruschat, H., Fodor, J., Harrach, B., Niemczyk, E., Barna, B., Gullner, G., . . . Schwarczinger, I. (2008). Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytol.; 180*, strony 501-510.

Bamisile, B. S., Oasim, M. i Wang, L. (2018). Prospects of endophytic fungal entomopathogens as biocontrol and plant growth promoting agents: As insight on how artificial inoculation methods affect endophytic colonization of host plants. *Microbiological Research; 217*, strony 34-50.

Banerjee, A. i Mittra, B. (2018). Morphological modification in wheat seedlings infected by *Fusarium oxysporum*. *Eur. J. Plant Pathol.; 152*, strony 521-524.

Bankina, B., Bimšteine, G., Neusa-Luca, I., Roga, A. i Fridmanis, D. (2017). What influences the composition of fungi in wheat grains? *Acta Agrobotanica; 70(4)*, str. 1726.

Bari, R. i Jones, J. (2009). Role of plant hormones in plant defense responses. *Plant Mol Biol. 69(4)*, strony 473–488.

Baron, N. i Rigobelo, E. (2021). Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. *Mycology; 13*, strony 39-55.

Basińska-Barczak, A. (2021). Zmiany zachodzące w roślinach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) w wyniku kolonizacji korzeni przez grzyby *Trichoderma. Rozprawa doktorska.* Poznań: Instytut Genetyki Roślin PAN.

Basińska-Barczak, A., Błaszczyk, L. i Szentner, K. (2020). Plant Cell Wall Changes in Common Wheat Roots as a Result of Their Interaction with Beneficial Fungi of *Trichoderma*. *Cells; 9*, str. 2319.

Bastian, F., Alabouvette, C. i Saiz-Jimenez, C. (2009). The impact of arthropods on fungal community structure in Lascaux Cave. *J. Appl. Microbiol.; 106*, strony 1456-1462.

Beccari, G., Caproni, L., Tini, F., Uhlig, S., Covarelli i L. (2016). Presence of *Fusarium* Species and Other Toxigenic Fungi in Malting Barley and Multi-Mycotoxin Analysis by Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem., 64*, strony 4390-4399.

Bencheqroun, S. i in. (2007). In vitro and in situ study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the involvement of competition for nutrients. *Postharvest Biol. Technol.; 46*, strony 128–135.

Bendahmane, A., Kanyuka, K. i Baulcombe, D. (1999). The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *The Plant Cell Online 11*, strony 781-791.

Bensch, K., Groenewald, J., Dijksterhuis, J., Starink-Willemse, M., Andersen, B., Summerell, B., . . . Crous, P. (2010). Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in mycology, 67*, strony 1–94.

Bessadat, N., Hamon, B., Bataille-Simoneau, N., Colou, J., Mabrouk, K. i Simoneau, P. (2022). Characterization of *Stemphylium spp*. associated with tomato foliar diseases in Algeria. *Phytopathologia Mediterranea, 61(1)*, strony 39-53.

Bhagyasree, S., Ghosh, S., Thippaiah, M. i Rajgopal, N. (2018). Survey on natural occurrence of endophytes in maize (*Zea mays* L.) ecosystem. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci., 7*, strony 2526–2533.

Błaszczyk, L., Basińska-Barczak, A., Ćwiek-Kupczyńska, H., Gromadzka, K., Popiel, D. i Stępień, Ł. (2017). Suppressive effect of *Trichoderma spp*. on toxigenic *Fusarium* species. *Pol. J. Microbiol.; 66*, strony 85-100.

Błaszczyk, L., Waśkiewicz, A., Gromadzka, K., Mikołajczak, K. i Chełkowski, J. (2021). *Sarocladium* and *Lecanicillium* Associated with Maize Seeds and Their Potential to Form Selected Secondary Metabolites. *Biomolecules, 11*, str. 98.

Bona, E., Cantamessa, S., Massa, N., Manassero, P., Marsano, F. i Copetta, A. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonads improve yield, quality and nutritional value of tomato: a field study. *Mycorrhiza 27*, strony 1-11.

Bouzouina, M., Kouadria, R. i Lotmani, B. (2021). Fungal endophytes alleviate salt stress in wheat in terms of growth, ion homeostasis and osmoregulation. *J. Appl. Microbiol., 130*, strony 913-925.

Breen, J. (1994). *Acremonium* Endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. *Annual Review of Entomology, 39(1)*, strony 401–423.

Brun, S., Madrid, H., Gerrits Van Den Ende, B., Andersen, B., Marinach-Patrice, C., Mazier, D. i De Hoog, G. (2013). Multilocus phylogeny and MALDI-TOF analysis of the plant pathogenic species *Alternaria dauci* and relatives. *Fungal Biol., 117*, strony 32-40.

Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S., Lorito, M., Kubicek, C. i Mach, R. (2005). Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Applied and environmental microbiology, 71(7)*, strony 3959–3965.

Burow, K., Grawunder, A., Harpke, M., Pietschmann, S., Ehrhardt, R., Wagner, L. i in. (2019). Microbiomes in an acidic rock–water cave system. *FEMS Microbiol. Lett.; 366*, str. fnz167.

Busby, P., Peay, K. i Newcombe, G. (2016). Common foliar fungi of *Populus trichocarpa* modify *Melampsora* rust disease severity. *New Phytol.; 209*, strony 1681-1692.

Busby, P., Ridout, M. i Newcombe, G. (2016b). Fungal endophytes: Modifiers of plant disease. *Plant Mol. Biol. 90*, strony 645-655.

Busk, P. i Pages, M. (1998). Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol.;37(3)*, strony 425-435.

Campos, C., Carvalho, M., Brígido, C., Goss, M. i Nobre, T. (2018). Symbiosis Specificity of the Preceding Host Plant Can Dominate but Not Obliterate the Association Between Wheat and Its Arbuscular Mycorrhizal Fungal Partners. *Front. Microbiol., 9*, str. 2920.

Cannon, P., Damm, U., Johnston, P. i Weir, B. (2008). *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology; 73*, strony 181-213.

Cao, M.-J., Wang, Z., Zhao, Q., Mao, J.-L., Speiser, A., Wirtz, M., . . . Xiang, C.-B. (2014). Sulfate Availability Affects ABA Levels and Germination Response to ABA and Salt Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J., 77*, strony 604-615.

Caplan, J., Padmanabhan, M. i Dinesh-Kumar, S. (2008). Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. *Cell Host Microbe; 3*, strony 126–135.

Carbone, I. i Kohn, L. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia.; 91*, strony 553-556.

Card, S., Faville, M., Simpson, W., Johnson, R., Voisey, C., de Bonth, A. i Hume, D. (2014). Mutualistic fungal endophytes in the *Triticeae*—Survey and description. *FEMS Microbiol. Ecol.; 88*, strony 94-106.

Carroll, G. (1988). Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology 69*, strony 2-9.

Casassola, A., Brammer, S., C. M., Martinelli, J., Stefanato, F. i Boyd, L. (2015). Changes in gene expression profiles as they relate to the adult plant leaf rust resistance in the wheat cv. Toropi. *Physiological and molecular plant pathology, 89*, strony 49-54.

Chaturvedi, V., DeFiglio, H. i Chaturvedi, S. (2018). Phenotype profiling of white-nose syndrome pathogen *Pseudogymnoascus destructans* and closely-related *Pseudogymnoascus pannorum* reveals metabolic differences underlying fungal lifestyles. *F1000Res.; 25(7)*, str. 665.

Chen, J., Shen, Y., Chen, C. i Wan, C. (2019). Inhibition of key citrus postharvest fungal strains by plant extracts in vitro and in vivo: A Review. *Plants; 8*, str. 26.

Chen, L., Sun, N., Wang, J., Ling, H., Zhang, L. i Zuo, K. (2013). Functional analysis of a wilt fungus inducible PR10-1 gene from cotton. *Am. J. Sci. 04*, strony 417-426.

Chen, X., Miché, L., Sachs, S., Wang, Q., Buschart, A. i Yang, H. (2015). Rice responds to endophytic colonization which is independent of the common symbiotic signaling pathway. *New Phytol 208* , strony 531-543.

Chunduri, V., Kaur, A., Kaur, S., Kumar, A., Sharma, S., Sharma, N., . . . Garg, M. (2021). Gene Expression and Proteomics Studies Suggest an Involvement of Multiple Pathways Under Day and Day–Night Combined Heat Stresses During Grain Filling in Wheat. *Front. Plant Sci. 12*, str. 660446.

Chung, K. i Schardl, C. (1997). Sexual cycle and horizontal transmission of the grass symbiont, *Epichloë typhina*. *Mycological Research 101*, strony 295-301.

Clarke, T., Shetty, K. i Jayachandran, K. (2007). *Myrothecium verrucaria* – a potential biological control agent for the invasive 'old world climbing fern' (*Lygodium microphyllum*). *BioControl, 52*, strony 399–411.

Clay, K. (1990). Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Ecology and Systematics 21*, strony 275-297.

Clay, K. (1992). Fungal endophytes of plants: biological and chemical diversity. *Nat Toxins, 1(3)*, strony 147-149.

Claydon, N., Allan, M., Hanson, J. i Avent, A. (1987). Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Transactions of the British Mycological Society; 88(4)*, strony 503-513.

Cohen, S. (2006). Host selectivity and genetic variation of *Discula umbrinella* isolates from two oak species: analyses of intergenic spacer region sequences of ribosomal DNA. *Microbial Ecology 52*, strony 463-469.

Collins, R. i Halim, A. (1972). Characterization of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride* (Pers.). *J Agr Food Chem.*, strony 437-438.

Comby, M., Gacoin, M., Robineau, M., Rabenoelina, F., Ptas, S., Dupont, J., . . . Baillieul, F. (2017). Screening of wheat endophytes as biological control agents against *Fusarium* head blight using two different in vitro tests. *Microbiol. Res.; 202*, strony 11-20.

Comby, M., Lacoste, S., Baillieul, F., Profizi, C. i Dupont, J. (2016). Spatial and temporal variation of cultivable communities of co-occurring endophytes and pathogens in wheat. *Front. Microbiol.; 7*, str. 403.

Compant, S., Clément, C. i Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem 42* , strony 669-678.

Cook, R. i Baker, K. (1983). *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens.* St. Paul, Mi, USA: American Phytopathological Society.

Costet, L., Cordelier, S., Dorey, S., Baillieul, F., Fritig, B. i Kauffmann, S. (1999). Relationship between localized acquired resistance (LAR) and the hypersensitive response (HR): HR is necessary for LAR to occur and salicylic acid is not sufficient to trigger LAR. *Molecular Plant-Microbe Interactions 12*, strony 655-662.

Covarelli, L., Beccari, G., Prodi, A., Generotti, S., Etruschi, F., Juan, C., . . . Mañes, J. (2015). *Fusarium* species, chemotype characterisation and trichothecene contamination of durum and soft wheat in an area of central Italy. *Journal of the science of food and agriculture, 95(3)*, strony 540–551.

Crismani, W., Baumann, U., Sutton, T., Shirley, N., Webster, T., Spangenberg, G., . . . Able, J. (2006). Microarray expression analysis of meiosis and microsporogenesis in hexaploid bread wheat. *BMC Genomics, 7*, str. 267.

Cui, Y., Zhang, X., Gong, Y., Niu, S., Yin, N., Yao, R., . . . Yin, Y. (2011). Immunization with DnaJ (hsp40) could elicit protection against nasopharyngeal colonization and invasive infection caused by different strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine, 29*, strony 1736-1744.

Cumagun, C. (2012). Managing plant diseases and promoting sustainability and productivity with *Trichoderma*: The Philippine Experience. *J.Agr.Sci. Tech.14*, strony 699-714.

Czaban, J., Wróblewska, B., Sułek, A., Mikos, M., Boguszewska, E., Podolska, G. i Nieróbca, A. (2015). Colonisation of winter wheat grain by *Fusarium spp*. and mycotoxin content as dependent on a wheat variety, crop rotation, a crop management system and weather condition. *Food Addit. Contam. Part A.; 32*, strony 874–910.

da Silva Lopes, R., de Lima, G., dos Santos Correia, M., da Costa, A., de Luna Alves Lima, E. i de Menezes Lima, V. (2017). The potential of *Isaria spp*. as a bioinsecticide for the biological control of Nasutitermes corniger. *Biocontrol Science and Technology; 27(9)*, strony 1038-1048.

Daguerre, Y., Levati, E., Ruytinx, J., Tisserant, E., Morin, E., Kohler, A., . . . Martin, F. (2017). Regulatory networks underlying mycorrhizal development delineated by genome-wide expression profiling and functional analysis of the transcription factor repertoire of the plant symbiotic fungus *Laccaria bicolor*. *BMC Genomics; 18*, str. 737.

Daneshkhah, R., Cabello, S., Rozanska, E., Sobczak, M., Grundler, F., Wieczorek, K. i Hofmann, J. (2013). *Piriformospora indica* Antagonizes Cyst Nematode Infection and Development in *Arabidopsis* Roots. *J. Exp. Bot., 64*, strony 3763-3774.

DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. (2021, listopad 20). Pobrano z lokalizacji www.danko.pl

Das, D., Bhat, R. i Selvaraj, R. (2020). Biocatalysis and Agricultural. *Biotechnology, 30*, strony 101875–101884.

Dash, C., Bamisile, B., Keppanan, R., Qasim, M., Lin, Y., Islam, S. i Wang, L. (2018). Endophytic entomopathogenic fungi enhance the growth of *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) and negatively affect the development and reproduction of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Microbial Pathogenesis, 125*, strony 385–392.

De Battista, J., Bacon, C., Severson, R., Plattner, R. i Bouton, J. (1990). Indole Acetic Acid Production by the Fungal Endophyte of Tall Fescue. *Agron. J., 82*, strony 878-880.

De Cal, A., Larena, I., Linan, M., Torres, R. i Lamarca, N. i. (2009). Population dynamics of *Epicoccum nigrum*, a biocontrol agent against brown rot in stone fruit. *Journal of Applied Microbiology; 106*, strony 592–605.

De Lamo, F. i Takken, F. (2020). BioControl by *Fusarium oxysporum* Using Endophyte-Mediated Resistance. *Front. Plant Sci., 11*, str. 37.

de Souza, J., Marano, A., Pires-Zottarelli, C., Chambergo, F. i Harakava, R. (2014). A new species of *Backusella* (Mucorales) from a Cerrado reserve in Southeast Brazil. *Mycol. Progr., 13*, str. 981.

De Souza, V., Inomoto, M., Pascholati, S., Roma-Almeida, R., Melo, T. i Rezende, D. (2015). Fitonematoides: Controle biológico e indução de resistência. *In Revisão Anual de Patologia de Plantas; Sociedade Brasileira de Fitopatologia*, strony 242-292.

Degrune, F., Theodorakopoulos, N., Dufrene, M., Colinet, G., Bodson, B., Hiel, M. i in. (2016). No favorable effect of reduced tillage on microbial community diversity in a silty loam soil (Belgium). *Agr Ecosyst Environ.; 224*, strony 2-21.

Del Carmen H Rodríguez, M., Evans, H., de Abreu, L., de Macedo, D., Ndacnou, M., Bekele, K. i Barreto, R. (2021). New species and records of *Trichoderma* isolated as mycoparasites and endophytes from cultivated and wild coffee in Africa. *Scientific reports, 11(1)*, str. 5671.

Desmond, O., Edgar, C., Manners, J., Maclean, D., Schenk, P. i Kazan, K. (2005). Methyl jasmonate induced gene expression in wheat delays symptom development by the crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum*. *Physiol Mol Plant Pathol.; 67*, strony 171-179.

di Menna, M., Finch, S., Popay, A. i Smith, B. (2012). A review of the *Neotyphodium lolii* / *Lolium perenne* symbiosis and its associated effects on animal and plant health, with particular emphasis on ryegrass staggers. *N Z Vet J, 60(6)*, strony 315-328.

Diagne-Leye, G., Almaraz-Lopez, T., Sy-Ndir, M., Mascarell, G., Tidiane Ba, A. i Roux, C. (2010). Systematic position of *Moesziomyces penicillariae* among *Ustilaginaceae*. *African Journal of Microbiology Research; 4(9)*, strony 740-747.

Diaz, G., Torres, R., Vega, M. i Latorre, B. (2009). Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes. *Int J Food Microbiol.; 133(1–2)*, strony 195-199.

Díaz-Rodríguez, A. M., Salcedo Gastelum, L. A., Félix Pablos, C. M., Parra-Cota, F., Santoyo, G., Puente, M. L., . . . de los Santos-Villalobos, S. (2021). The Current and Future Role of Microbial Culture Collections in Food Security Worldwide. *Frontiers in Sustainable Food Systems 4*, str. e614739.

Dingle, J. i McGee, P. (2003). Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f. *sp. tritici* in wheat. *Mycological Research, 107(3)* , strony 310–316.

Djonovic, S., Pozo, M., Dangott, L., Howell, C. i Kenerley, C. (2006). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungi *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions, 19*, strony 838-853.

Dolatabad, H., Javan-Nikkhah, M. i Shier, W. (2017). Evaluation of antifungal, phosphate solubilisation, and siderophore and chitinase release activities of endophytic fungi from Pistacia vera. *Mycol. Prog., 16*, strony 777–790.

Dominguez-Moñino, I., Jurado, V., Rogerio-Candelera, M., Hermosin, B. i Saiz-Jimenez, C. (2021). Airborne fungi in show caves from southern Spain. *Appl. Sci.; 11*, str. 5027.

Domsch, K., Gams, W. i Anderson, T. (1980). *Compendium of Soil Fungi.* Londyn: Academic Press.

Driedonks, N., Xu, J., Peters, J., Park, S. i Rieu, I. (2015). Multi-Level Interactions Between Heat Shock Factors, Heat Shock Proteins, and the Redox System Regulate Acclimation to Heat. *Front. Plant Sci., 6*, str. 999.

Drobek, M., Cybulska, J., Gałązka, A., Feledyn-Szewczyk, B., Marzec-Grządziel, A., Sas-Paszt, L., . . . Frąc, M. (2021). The Use of Interactions Between Microorganisms in Strawberry Cultivation (Fragaria x ananassa Duch.). *Front. Plant Sci.; 12* , str. 780099.

Drouin, G., Moniz de Sa, M. i Zuker, M. (1995). The Giardia lamblia actin gene and the phylogeny of eukaryotes. *J. Mol. Evol. 41*, strony 841-849.

Duan, Z., Lv, G. i Shen, C. (2014). The role of jasmonic acid signalling in wheat (*Triticum aestivum* L.) powdery mildew resistance reaction. *Eur J Plant Pathol, 140*, str. 169.

Duczek, L. (1997). Biological control of common root rot in barley by *Idriella bolleyi*. *Can. J. Plant Pathol.; 19*, strony 402–405.

Eaton, C., Cox, M. i Scott, B. (2011). What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism? *Plant Sci, 180(2)*, strony 190-195.

Edington, L., Khew, K. i Barron, G. (1971). Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology 61*, strony 42-44.

Edlind, T. L., Visvesvara, G., Vodkin, M., McLaughlin, G. i Katiyar, S. (1996). Phylogenetic analysis of beta-tubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Mol. Phylogenet. Evol. 5*, strony 359-367.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2011). Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA J., 9*, str. 2407.

Egamberdieva, D., Wirth, S., Alqarawi, A., Abd Allah, E. i Hashem, A. (2017). Phytohormones and beneficial microbes. Essential components for plants to balance stress and fitness. *Front. Microbio.; 8*, str. 2104.

El Enshasy, H., Ambehabati, K., El Baz, A., Ramchuran, S. i Sayyed, R. (2020). *Trichoderma*: biocontrol agents for promoting plant growth and soil health. W A. Yadav, S. Mishra, D. Kour, N. Yadav i A. Kumar, *Agriculturally Important Fungi for Sustainable Agriculture. Functional Annotation for Crop Protection, Vol. 2.* Cham: Springer.

Elbasyoni, I. (2018). Performance and stability of commercial wheat cultivars under terminal heat stress. *Agronomy 8*, str. 37.

El-Sharkawy, H., Rashad, Y. i Ibrahim, S. (2018). Biocontrol of stem rust disease of wheat using arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma spp*. *Physiological and Molecular Plant Pathology; 103*, strony 84-91.

Elsherbiny, E., Taher, M. i Elsebai, M. (2019). Activity of *Purpureocillium lilacinum* Filtrates on Biochemical Characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum* and Induction of Defense Responses in Common Bean. *Eur. J. Plant Pathol.; 155*, strony 39-52.

Esmaeili Taheri, C., Hamel, C. i Gan, Y. (2016). Cropping practices impact fungal endophytes and pathogens in durum wheat roots. *Appl. Soil Ecol.; 100*, strony 104-111.

Esmail, S., Aboulila, A. i Abd El-Moneim, D. (2020). Variation in several pathogenesis - Related (PR) protein genes in wheat (*Triticum aestivum*) involved in defense against *Puccinia striiformis* f. *sp. tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology; 112*, str. 101545.

Fadiji, A. i Babalola, O. (2020). Elucidating Mechanisms of Endophytes Used in Plant Protection and Other Bioactivities with Multifunctional Prospects. *Front. Bioeng. Biotechnol., 8*, str. 467.

Faeth, S. i Hammon, K. (1997). Fungal endophytes in oak trees: long-term patterns of abundance and associations with leafminers. *Ecology; 78L*, strony 810-819.

Faeth, S. i Sullivan, T. (2003). Mutualistic asexual endophytes in a native grass are usually parasitic. *Am Nat, 161(2)*, strony 310-325.

Farag, F., Ghebrial, E., Abou Zeid, M. i Atwa, A. (2022). First Report of *Stemphylium* Leaf Spot of Wheat Caused by *Stemphylium vesicarium* in Egypt. *Egyptian Journal of Phytopathology, 50(1)*, strony 20-20.

Farrakh, S., Wang, M. i Chen, X. (2018). Pathogenesis-related protein genes involved in race-specific all-stage resistance and non-race specific high-temperature adult-plant resistance to *Puccinia striiformis* f. *sp. tritici* in wheat. *J. Integr. Agr. 17*, strony 2478-2491.

Fatemi, L., Shadmani, S. i Jamali, A. (2018). Biocontrol activity of endophytic fungus of barley, *Microdochium bolleyi*, against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Mycologia Iranica; 5(1)*, strony 7–14.

Feldman, M. (1976). Wheat. W N. S. (ed), *Evolution of crop plants* (strony 120-128). Londyn: Longman.

Fernandez, M., Basnyat, P. i Zentner, R. (2007). Response of common root rot in wheat to crop management in eastern Saskatchewan. *Can J Plant Sci.; 87*, strony 953-963.

Fessel, P. i Zuccaro, A. Beta-glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genetics and Biology; 90*, strony 53-60.

Feuillet, C., Langridge, P. i Waugh, R. (2007). Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends Genet 24*, strony 24-32.

Fierer, N. i Jackson, R. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. . *Proc Natl Acad Sci U S A 103*, strony 626-631.

Fierro-Cruz, J., Jiménez, P. i Coy-Barrera, E. (2017). Fungal endophytes isolated from *Protium heptaphyllum* and *Trattinnickia rhoifolia* as antagonists of *Fusarium oxysporum*. *Revista Argentina de Microbiología; 49(3)*, strony 255-263.

Firáková, S., Šturdíková, M. i Múčková, M. (2007). Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia 62*, strony 251–257.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2021, listopad 16). Pobrano z lokalizacji FAO: https://www.fao.org/faostat/en/#home

Franken, P. (2012). The plant strengthening root endophyte *Piriformospora indica*, potential application, and the biology behind it. *Appl. Microbiol. Biotech.; 96*, strony 1455-1464.

Gaju, O., Allard, V., Martre, P., Le Gouis, J., Moreau, D. i Bogard, M. (2014). Nitrogen partitioning and remobilization in relation to leaf senescence, grain yield and grain nitrogen concentration in wheat cultivars. *Field Crops Res. 155*, strony 213-223.

Gamalero, E. i Glick, B. (2012). Ethylene and abiotic stress tolerance in plants. W P. Ahmed i M. Prasad, *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change.* (strony 395-412). New York: Springer.

Gamborg, O., Miller, R. i Ojima, K. (1968). Nutrient Requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Research 50*, strony 151-158.

Gannibal, P., Orina, A., Kononenko, G. i Burkin, A. (2022). Distinction of *Alternaria* Sect. Pseudoalternaria Strains among Other *Alternaria* Fungi from Cereals. *J. Fungi, 8*, str. 423.

Gao, C., Kou, X., Li, H., Zhang, J., Saad, A. i Liao, Y. (2013). Inverse effects of *Arabidopsis* NPR1 gene on *Fusarium* seedling blight and *Fusarium* head blight in transgenic wheat. *Plant Pathol.; 62*, strony 383-392.

Garnica-Vergara, A., Barrera-Ortiz, S., Muñoz-Parra, E., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., . . . López-Bucio, J. (2016). The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *The New phytologist, 209(4)*, strony 1496–1512.

Garrido, E. i Pérez-Martín, J. (2003). The crk1 gene encodes an Ime2-related protein that is required for morphogenesis in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol. 47*, strony 729-743.

Gaur, R., Singh, R., Gupta, M., Kumar, M. i Gaur, M. (2010). *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. *Afr. J. Biotechnol., 9*, strony 7989–7997.

Gdanetz, K. i Trail, F. (2017). Wheat microbiome under four management strategies, and potential for endophytes in disease protection. *Phytobiomes, 1*, strony 158-168.

Geiser, D., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N. i Ward, T. i. (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur J Plant Pathol.; 110*, strony 473-479.

Genre, A. i Russo, G. (2016). Does a common pathway transduce symbiotic signals in plant–microbe interactions? *Front Plant Sci 7*, strony 1-8.

Genre, A., Lanfranco, L., Perotto, S. i Bonfante, P. (2020). Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. *Nat Rev Microbiol 18*, strony 649-660.

Girsowicz, R., I., M. i Steinberger, Y. (2019). Bacterial seed endophyte community of annual plants modulated by plant photosynthetic pathways. *Microbiol Res*, strony 58-62.

Glass, N. i Donaldson, G. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol.; 61*, strony 1323-1330.

Gonzalez, V., Armijos, E. i Garcés-Claver, A. (2020). Fungal endophytes as biocontrol agents against the main soil-borne diseases of melon and watermelon in Spain. *Agronomy; 10* , str. 820.

Goswami, J., Pandey, R., Tewari, J. i Goswami, B. (2008). Management of root knot nematode on tomato through application of fungal antagonists, *Acremonium strictum* and *Trichoderma harzianum*. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes, 43*, strony 237-240.

Gómez-Cortecero, A., Saville, R., Scheper, R., Bowen, J., Medeiros, H., Kingsnorth, J., . . . Harrison, R. (2016). Variation in host and pathogen in the *Neonectria*/Malus interaction; toward an understanding of the genetic basis of resistance to European canker. *Front Plant Sci.; 7(15)*, strony 1365–1379.

Grabka, R., d'Entremont, T., Adams, S., Walker, A., Tanney, J. i Abbasi, P. (2022). Fungal endophytes and their role in agricultural plant protection against pests and pathogens. *Plants; 11*, str. 384.

Gromadzka, K., Błaszczyk, L., Chełkowski, J. i Waśkiewicz, A. (2019). Occurrence of Mycotoxigenic *Fusarium* Species and Competitive Fungi on Preharvest Maize Ear Rot in Poland. *Toxins, 11*, str. 224.

Grunewaldt-Stöcker, G. i von Alten, H. (2003). Plant health effects of *Acremonium* root endophytes compared to those of arbuscular mycorrhiza. W J. Abe, *Roots: The Dynamic Interface between Plants and the Earth* (strony 445-454). Dordrecht: Springer .

Guest, D. i Brown, J. (1997). Plant defences against Pathogens. *Plant Pathogens and Plant Diseases New South Wales*.

Guler, N., Pehlivan, N., Karaoglu, S., Guzel, S. i Bozdeveci, A. (2016). *Trichoderma atroviride* ID20G Inoculation Ameliorates Drought Stress-Induced Damages by Improving Antioxidant Defence in Maize Seedlings. *Acta Physiol. Plant, 38*, str. 132.

Guo, H., Zhang, H., Wang, G., Wang, C., Wang, Y., Liu, X. i Ji, W. (2021). Identification and expression analysis of heat-shock proteins in wheat infected with powdery mildew and stripe rust. *Plant Genome; 14*, str. e20092.

Gupta, P., Mir, R., Mohan, A. i Kumar, J. (2008). Wheat genomics: present status and future prospects. *International Journal of Plant Genomics Article ID 896451*, str. 36.

Gyung, J., Jin-Cheol, K., Kyoung, S., Myeong, H., Seon-Woo, L. i Heung, T. (2009). Biocontrol activity of *Acremonium strictum* BCP against botrytis diseases. *Plant Pathol. J., 25*, strony 165-171.

Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.; 41*, strony 95-98.

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. i Kloepper, J. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology 43*, strony 895-914.

Hamayun, M., Khan, S., Iqbal, I., Na, C., Khan, A., Hwang, Y. i in. (2009). *Chrysosporium pseudomerdarium* produces gibberellins and promotes plant growth. *J. Microbiol. 47*, strony 425-430.

Han, P., Zhang, X., Xu, D., Zhang, B., Lai, D. i Zhou, L. (2020). Metabolites from *Clonostachys* Fungi and Their Biological Activities. *J Fungi (Basel).; 6(4)*, str. 229.

Haney, C., Samuel, B., Bush, J. i Ausubel, F. (2015). Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nat Plants 1*, str. 1.

Hanin, M., Ebel, C., Ngom, M., Laplaze, L. i Masmoudi, K. (2016). New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. *Front Plant Sci 7*, strony 1-17.

Hao, Y., Aluthmuhandiram, J., Chethana, K., Manawasinghe, I., Li, X., Liu, M., . . . Zhang, W. (2020). *Nigrospora* Species Associated with Various Hosts from Shandong Peninsula, China. *Mycobiology, 48(3)*, strony 169-183.

Hardoim, P. R., van Overbeek, L., Berg, G., Pirttilä, A., Compant, S., Campisano, A., . . . Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR, 79(3)*, strony 293–320.

Hardoim, P., van Overbeek, L., Berg, G., Pirttiläd, A., Compante, S., Campisanof, A., . . . Sessitsche, A. (2015). The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.; 79*, strony 293-320.

Harney, S. i Widden, P. (1991). Physiological Properties of the Entomopathogenic Hyphomycete Paecilomyces farinosus in Relation to its Role in the Forest Ecosystem. *Canadian Journal of Botany, 69*, str. 15.

Hartman, K. i. (2018). Cropping practices manipulate abundance patterns of root and soil microbiome members paving the way to smart farming. *Microbiome 6*, str. 14.

Hartmann, A., Rothballer, M. i Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil 312*, strony 7-14.

Hashem, M. i Ali, E. (2004). *Epicoccum nigrum* as biocontrol agent of *Pythium* damping-off and root-rot of cotton seedlings. *Archives of Phytopathology and Plant Protection; 37*, strony 283–297.

Hassan, M., McInroy, J. i Kloepper, J. (2019). The interactions of rhizodeposits with plant growth-promoting rhizobacteria in the rhizosphere: A review. *Agric 9*, str. 9.

Hay, F., Stricker, S., Gossen, B., McDonald, M., Heck, D., Hoepting, C., . . . Pethybridge, S. (2021). *Stemphylium* Leaf Blight: A Re-Emerging Threat to Onion Production in Eastern North America. *Plant disease, 105(12)*, strony 3780–3794.

Heggeenstaller, A. (2012). Managing soil pH for crop production. *Crop Insight. 22(15)*, strony 1-4.

Henry, G., Thonart, P. i Ongena, M. (2012). PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 6*, strony 257-268.

Heydari, A. i Pessarakli, M. (2010). A Review on Biological Control of Fungal Plant Pathogens Using Microbial Antagonists. *Journal of Biological Sciences; 10(4)*, strony 273-290.

Hodowla Roślin STRZELCE Sp. z o.o. (2021, listopad 20). Pobrano z lokalizacji https://hr-strzelce.pl/odmiany/

Hong, S., Go, S., Shin, H., Frisvad, J. i Samson, R. (2005). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*, *97(6)*, strony 1316–1329.

Horiike, T. i Yamashita, M. (2015). A new fungal isolate, *Penidiella sp*. Strain T9, accumulates the rare Earth element Dysprosium. *Applied and Environmental Microbiology, 81(9)*, strony 3062-3068.

Hormazabal, E. i Piontelli, E. (2009). Endophytic fungi from Chilean native gymnosperms: antimicrobial activity against human and phytopathogenic fungi. *World J Microb Biot.; 25*, strony 813-819.

Hosseini, F., Mosaddeghi, M., Dexter, A. i Sepehri, M. (2019). Effect of Endophytic Fungus *Piriformospora indica* and PEG-Induced Water Stress on Maximum Root Growth Pressure and Elongation Rate of Maize. *Plant Soil, 435*, strony 423–436.

Huang, S., Sirikhachornkit, A., Su, X., Faris, J., Gill, B., Haselkorn i Gornicki, P. (2002). Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum*/*Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploidy wheat. *PNAS 99(12)*, strony 8133-8138.

Huang, W., Cai, Y., Hyde, K., Corke, H. i Sun, M. (2008). Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity 33*, strony 61-75.

Huang, X., Ma, J., Chen, X., Wang, X., Ding, K., Han, D., . . . Kang, Z. (2013). Genes involved in adult plant resistance to stripe rust in wheat cultivar Xingzi 9104. *Physiol. Mol. Plant Pathol. 81*, strony 26-32.

Huber, A. i Bauerle, T. (2016). Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: the gap in knowledge. *J. Exp. Bot. 67*, strony 2063-2079.

Hue, A., Voldeng, H., Savard, M., Fedak, G., Tian, X. i Hsiang, T. (2009). Biological control of fusarium head blight of wheat with *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Canadian Journal of Plant Pathology, 31(2)*, strony 169-179.

Hyde, K. i Soytong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity 33*, strony 163-173.

Iannone, L., Vignale, M., Pinget, A., Re, A., Mc Cargo, P. i Novas, M. (2017). Seed-transmitted *Epichloë sp*. endophyte alleviates the negative effects of head smut of grasses (*Ustilago bullata*) on *Bromus auleticus*. *Fungal Ecology, 29*, strony 45-51.

Iftikhar, S., Asad, S., Sultan, A., Munir, A. i Ahmad, I. (2008). Occurrence of *Colletotrichum graminicola* on wheat in Pakistan. *Archives of Phytopathology and Plant Protection, 41(4)*, strony 305-307.

Ikeda, K., Kuwabara, K., Urushibara, T., Soyai, P., Miki, S. i Shibata, S. (2012). Pink root rot of squash caused by *Setophoma terrestris* in Japan. *J Gen Plant Pathol.; 78*, strony 372-375.

Istifadah, N. i McGee, P. (2006). Endophytic *Chaetomium globosum* reduces development of tan spot in wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Australas. Plant Pathol.; 35*, strony 411-418.

Jaaska, V. (1980). Electrophoretic survey of seedling esterases in wheats in relation to their phylogeny. *Theor. Appl. Genet 56*, strony 273-283.

Jackson, D., Skillman, J. i Vandermeer, J. (2012). Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. *Biological Control, 61*, strony 89-97.

Jamiołkowska, A., Hetman, B., Skwaryło-Bednarz, B. i Kopacki, M. (2017). Integrowana ochrona roślin w Polsce i Unii Europejskiej oraz prawne podstawy jej funkcjonowania. Praca przeglądowa. *Annales UMCS, sec. E, Agricultura, 72(1)*, strony 103-111.

Jatala, P., Kaltenbach, R. i Rocangel, M. (1981). Multiple Application and Longterm Effect of *Paecilomyces lilacinus* in Controlling *Meloidogyne incognita* under Field Conditions. *J. Nematol.; 13*, str. 445.

Jeewon, R., Liew, E. i Hyde, K. (2004). Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association. *Fungal Diversity 17*, strony 39-55.

Jeleń, H., Błaszczyk, L., Chełkowski, J., Rogowicz, K. i Strakowska, J. (2014). Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. *Mycol Progress.; 13*, strony 589-600.

Jensen, B., Knorr, K. i Nicolaisen, M. (2016). In vitro competition between *Fusarium graminearum* and *Epicoccum nigrum* on media and wheat grains. *Eur J Plant Pathol.; 146*, strony 657–670.

Jensen, B., Knudsen, I. i Jensen, D. (2000). Biological seed treatment of cereals with fresh and long-term stored formulations of *Clonostachys rosea*: biocontrol efficacy against *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology, 106(3)*, strony 233-242.

Johnson, L., De Bonth, A., Briggs, L. i Ret. (2013). The exploitation of Epichloae endophytes for agricultural benefit. *Fungal Divers; 60*, str. 17188.

Johnson, S. i Lincoln, D. (2000). Allocation responses in CO_2 enrichment and defoliation by a native annual plant *Heterothea subaxllaris*. *Global Change Biology 6*, strony 767-778.

Jones, J. i Dangl, J. (2006). The plant immune system. *Nature 444*, strony 323–329.

Jumpponen, A. (2001). Dark septate endophytes – are they mycorrhizal? *Mycorrhiza 11*, strony 207-211.

Jurczyk, B., Pociecha, E., Janeczko, A., Paczyński, R. i Rapacz, M. (2014). Assessment of candidate reference genes for the expression studies with brassinosteroids in *Lolium perenne* and *Triticum aestivum*. *J Plant Physiol.,15*, strony 1541-1544.

Kallamadi, P., Dandu, K. i Kirti, P. (2018). An Insight into Powdery Mildew–Infected, Susceptible, Resistant and Immune Sunflower Genotypes. *Proteomics, 18*, str. 1700418.

Kanchiswamy, C., Malnoy, M. i Maffei, M. (2015). Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. *Trends Plant Sci. 20*, strony 206-211.

Kapoor, D. i Karnwal, A. (2021). Yeast as plant growth promoter and biocontrol agent. W V. Kumar Sharma, M. Shah, S. Parmar i A. Kumar, *Fungi Bio-Prospects in Sustainable Agriculture, Environment and Nano-Technology* (strony 429-457). Academic Press.

Karadžić, D., Stanivuković, Z., Milanović, S., Sikora, K., Radulović, Z., Račko, V., . . . Milenković, I. (2020). Development of *Neonectria punicea* Pathogenic Symptoms in Juvenile Fraxinus excelsior Trees. *Frontiers in Plant Science; 11*, str. 592260.

Karlsson, I., Friberg, H., Steinberg, C. i Persson, P. (2014). Fungicide effects on fungal community composition in the wheat phyllosphere. *PLoS ONE; 9*, str. e0111786.

Katar, Ş., Erol, S., Aytar Çelik, P., Özdemir, M. i Çabuk, A. (2017). *Talaromyces aculeatus* from acidic environment as a new fungal biosorbent for removal of some reactive textile dyes. *ANADOLU Univ. J. Sci. Technol. A - Appl. Sci. Eng.* , strony 521-534.

Kaur, A., Pati, P., Pati, A. i Nagpal, A. (2017). In-silico analysis of cis-acting regulatory elements of pathogenesis-related proteins of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *PLoS One 12*, str. 9.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., . . . Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England), 28(12)*, strony 1647–1649.

Keegstra, K. (2010). Plant cell walls. *Plant Physiol 154*, strony 483-486.

Kerby, K., Kuspira, J. i Jones, B. (1988). Biochemical data bearing on the relationship between the genome of *Triticum urartu* and the A and B genomes of the polyploid wheats. *Genome 30(4)*, strony 576-581.

Keswani, C., Singh, S., García-Estrada, C., Mezaache-Aichour, S., Glare, T. i Borriss, R. (2022). Biosynthesis and beneficial effects of microbial gibberellins on crops for sustainable agriculture. *Journal. of Applied. Microbiology; 132*, strony 1597-1615.

Khan, A., Waqas, M., Khan, A., Hussain, J. i Kang, S. (2013). Fungal endophyte *Penicillium janthinellum* LK5 improves growth of ABA deficient tomato under salinity. *World J. Microbiol. Biotechnol.; 29*, strony 2133-2144.

Khastini, R., Ogawara, T., Sato, Y. i in., i. (2014). Control of *Fusarium* wilt in melon by the fungal endophyte, *Cadophora sp*. *Eur J Plant Pathol.; 139*, strony 339–348.

Király, L., Barna, B. i Király, Z. (2007). Plant Resistance to Pathogen Infection: Forms and Mechanisms of Innate and Acquired Resistance. *Journal of Phytopathology, 155*, strony 385-396.

Kirschner, R. (2001). Diversity of Filamentous Fungi in Bark Beetle Galleries in Central Europe. W: J. Misra i B. Horn, *Trichomycetes and Other Fungal Groups* (strony 175-196). Plymouth, UK: Science Publishers, Inc.

Klaedtke, S., Jacques, M., Raggi, L., Préveaux, A., Bonneau, S., Negri, V., . . . Barret, M. (2016). Terroir is a key driver of seed-associated microbial assemblages. *Environmental microbiology, 18(6)*, strony 1792–1804.

Knapp, D., Pintye, A. i Kovács, G. (2012). The dark side is not fastidious--dark septate endophytic fungi of native and invasive plants of semiarid sandy areas. *PLoS One.; 7(2)*, str. e32570.

Knutsen, A., Bush, R., Demain, J., Denning, D., Dixit, A., Fairs, A., . . . Wardlaw, A. (2012). Fungi and allergic lower respiratory tract diseases. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology; 129(2)*, strony 280-293.

Kogel, K., Franken, P. i Huckelhoven, R. (2006). Endophyte or parasite - what decides? *Current Opinion in Plant Biology 9*, strony 358-363.

Kohli, A., Sreenivasulu, N., Lakshmanan, P. i Kumar, P. (2013). The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. *Plant Cell Rep.;32(7)*, strony 945-957.

Komai, S., Hosoe, T., Itabashi, T., Nozawa, K., Yaguchi, T., Fukushima, K. i Kawai, K. (2006). New penicillide derivatives isolated from *Penicillium simplicissimum*. *J. Nat. Med., 60*, strony 185-190.

Kong, H., Song, G. i Ryu, C. (2019). Inheritance of seed and rhizosphere microbial communities through plant–soil feedback and soil memory. *Environ Microbiol Rep 11* , strony 479-486.

Kottb, M., Gigolashvili, T., Großkinsky, D. i Piechulla, B. (2015). *Trichoderma* volatiles effecting *Arabidopsis*: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. *Front Microbiol. 6*, str. 995.

Krings, M., Taylor, T., Hass, H., Kerp, H., Dotzler, N. i Hermsen, E. (2007). Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: Infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytol 174*, strony 648-657.

Kriss, A., Paul, P., Xu, X., Nicholson, P., Doohan, F., Hornok, L., . . . Madden, L. (2012). Quantification of the relationship between the environment and *Fusarium* head blight, *Fusarium* pathogen density, and mycotoxins in winter wheat in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.; 133*, strony 975-993.

Kubienova, L., Sedlarova, M., Viteckova Wunschova, A., Piterkova, J., Luhova, L., Mieslerova, B., . . . Petrivalsky, M. (2013). Effect of extreme temperatures on Powdery Mildew development and Hsp70 induction in Tomato and wild *Solanum spp*. *Plant Prot. Sci.; 49*, strony 41-54.

Kulik, T., Treder, K. i Załuski, D. (2015). Quantifcation of *Alternaria, Cladosporium, Fusarium* and *Penicillium verrucosum* in conventional and organic grains by qPCR. *J. Phytopathol.; 163*, strony 522-528.

Kullnig-Gradinger, C., Szakacs, G. i Kubicek, C. (2002). Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycol Res.; 106*, strony 757-767.

Kumar, K., Amaresan, N., Bhagat, S., Madhuri, K. i Srivastava, R. (2012). Isolation and Characterization of *Trichoderma spp*. for Antagonistic Activity Against Root Rot and Foliar Pathogens. *Indian journal of microbiology; 52(2)*, strony 137-144.

Kumar, M. (2013). Crop plants and abiotic stresses. *Biomolecular Research & Therapeutics 3(1)*, str. 1000e125.

Kumar, R., Singh, G., Goswami, S., Pathak, H. i Rai, R. (2014). Proteome analysis of wheat ('*Triticum aestivum*') for the identification of differentially expressed heat-responsive proteins. *Aust. J. Crop Sci.; 8*, strony 973-986.

Kumar, S., Knox, R., Singh, A., DePauw, R., Campbell, H. i Isidro-Sanchez, J. (2018). High-density genetic mapping of a major QTL for resistance to multiple races of loose smut in a tetraploid wheat cross. *PLoS One 13(2)*, str. e0192261.

Kumar, S., Thakur, M. i A., R. (2014). *Trichoderma*: Mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases. *African Journal of Agricultural Research 9(53)*, strony 3838-3852.

Kumaraswamy, S. i Shetty, P. (2016). Critical abiotic factors affecting implementation of technological innovations in rice and wheat production: A review. *Agricultural Reviews 37(4)*, strony 268-278.

Kunos, V., Cséplő, M., Seress, D., Eser, A., Kende, Z., Uhrin, A., . . . Mészáros, K. (2022). The Stimulation of Superoxide Dismutase Enzyme Activity and Its Relation with the *Pyrenophora teres* f. *teres* Infection in Different Barley Genotypes. *Sustainability; 14(5)*, str. 2597.

Kurowski, T, P., Damszel, M. i Wysocka, U. (2012). Fungi colonizing the grain of spring wheat grown in the conventional and organic system. *Phytopathologia.; 63*, strony 39-50.

Kusari, S., Hertweck, C. i Spiteller, M. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry and Biology 19*, strony 792-798.

Kushiro, M., Saitoh, H., Sugiura, Y., Aoki, T., Kawamoto, S. i Sato, T. (2012). Experimental infection of *Fusarium proliferatum* in *Oryza sativa* plants; fumonisin B1 production and survival rate in grains. *Int. J. Food Microbiol.; 156*, strony 204-208.

Kuzdraliński, A., Kot, A., Szczerba, H., Nowak, M. i Muszyńska, M. (2017). A review of Conventional PCR assays for the detection of selected phytopathogens of wheat. *J. Mil. Microbiol. Biotechnol.; 27*, strony 175-189.

Kuzmanovska, B., Rusevski, R., Jankulovska, M. i Oreshkovikj, K. (2018). Antagonistic activity of *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma harzianum* against genetically diverse *Botrytis cinerea* isolates. *Chil J Agr Res.; 78*, strony 391-399.

Laihonen, M., Saikkonen, K., Helander, M. i Vázquez, D. A. (2022). *Epichloë* Endophyte-Promoted Seed Pathogen Increases Host Grass Resistance Against Insect Herbivory. *Frontiers in Microbiology; 12*, str. 786619.

Landi, S., Capasso, G., Ben Azaiez, F., Jallouli, S., Ayadi, S., Trifa, Y. i Esposito, S. (2019). Different roles of heat shock proteins (70 kDa) during abiotic stresses in barley (*Hordeum vulgare*) genotypes. *Plants, 8*, str. 248.

Larena, I. i Melgarejo, P. (2009). Development of a new strategy for monitoring *Epicoccum nigrum* 282, a biological control agent used against brown rot caused by *Monilinia spp.* in peaches. *Postharvest Biology and Technology; 54*, strony 63–71.

Larran, S., Perello, A., Simon, M. i Moreno, V. (2002). Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aesti*vum L.) leaves. *World J. Microbiol. Biotech.; 18*, strony 683-686.

Larran, S., Perello, A., Simon, M. i Moreno, V. (2007). The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.; 23*, strony 565-572.

Larran, S., Simón, M., Moreno, M., Santamarina Siurana, M. i Perelló, A. (2016). Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease. *Biological Control; 92*, strony 17-23.

Lata, C. i Prasad, M. (2011). Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *J Exp Bot. 62(14)*, strony 4731–4748.

Lata, R., Chowdhury, S., Gond, S. i White, J. (2018). Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. *Lett. Appl. Microbiol.; 66*, strony 268-276.

Latz, M., Jensen, B., Collinge, D. i Lyngs Jørgensen, H. (2020). Identification of two endophytic fungi that control *Septoria tritici* blotch in the field, using a structured screening approach. *Biol. Control., 141*, str. 104128.

Laur, J., Spanu, P., Ramakrishnan, G., Bélanger, R., Labbé, C. i Lefebvre, F. (2017). Effectors involved in fungal-fungal interaction lead to a rare phenomenon of hyperbiotrophy in the tritrophic system biocontrol agent-powdery mildew-plant. *New Phytol., 217*, strony 713-725.

Lazzaro, I., Moretti, A., Giorni, P., Brera, C. i Battilani, P. (2015). Organic vs conventional farming: diferences in infection by mycotoxin-producing fungi on maize and wheat in Northern and Central Italy. *Crop Prot.; 72*, strony 22-30.

Le Cocq, K., Gurr, S., Hirsch, P. i Mauchline, T. (2017). Exploitation of endophytes for sustainable agricultural intensification. *Molecular plant pathology, 18(3)*, strony 469–473.

Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D. i Moënne-Loccoz, Y. (2017). Let the Core Microbiota Be Functional. *Trends in plant science, 22(7)*, strony 583–595.

Lenc, L., Kwaśna, H., Sadowski, C. i Grabowski, A. (2015). Microbiota in wheat roots, rhizosphere and soil in crops grown in organic and other production systems. *J Phytopathol.; 163*, strony 245-263.

Leng, L., Liang, Q., Jiang, J., Zhang, C., Hao, Y., Wang, X. i Su, W. (2017). A subclass of HSP70s regulate development and abiotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research, 130*, strony 349–363.

Leplat, J., François, A. i Bousta, F. (2020). *Parengyodontium album*, a frequently reported fungal species in the cultural heritage environment. *Fungal Biology Reviews, 34(3)*, strony 126-135.

Leslie, J., Anderson, L., Bowden, R. i Lee, Y.-W. (2007). Inter– and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. *Int. J. Food Microbiol. 119*, strony 25–32.

Li, H., Da-Qiao, W., Mi, S. i Zuo-Ping, Z. (2012). Endophytes and their role in phytoremediation. *Fungal. Div. 54*, strony 11-18.

Li, J., Brader, G. i Palva, E. (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell.;16(2)*, strony 319-331.

Li, J., Jiang, G., Yang, B., Dong, X., Feng, L., Lin, S. i in. (2012). A luminescent bacterium assay of fusaric acid produced by *Fusarium proliferatum* from banana. *Anal. Bioanal. Chem. 402*, strony 1347–1354.

Li, N., Xu, D., Huang, R.-H., Zheng, J.-Y., Liu, Y.-Y., Hu, B.-S., . . . Du, Q. (2022). A New Source of Diterpene Lactones From *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees—Two Endophytic Fungi of *Colletotrichum sp*. With Antibacterial and Antioxidant Activities. *Front. Microbial.; 13*, str. 819770.

Li, N., Yin, N., Niu, Z., Hui, W., Song, J., Huang, C. i in. (2014). Isolation and characterization of three TaYUC10genes from wheat. *Gene, 546*, strony 187-194.

Li, R., Feng, Y., Chen, H., Zhang, C., Huang, Y. i Chen, L. (2020). Whole-Genome Sequencing of *Bradyrhizobium diazoefficiens* 113–2 and Comparative Genomic Analysis Provide Molecular Insights Into Species Specificity and Host Specificity. *Front Microbiol 11*, strony 1-17.

Li, R.-X., Cai, F., Pang, G., Shen, Q.-R., Li, R. i Chen, W. (2015). Solubilisation of Phosphate and Micronutrients by *Trichoderma harzianum* and Its Relationship with the Promotion of Tomato Plant Growth. *PLoS ONE 10(6)*, str. e0130081.

Li, W. i Cui, X. (2014). A special issue on plant stress biology: From model species to crops. *Molecular Plant. 7*, strony 755-757.

Li, Y.-M., Shivas, R., Li, B.-J. i Cai, L. (2019). Diversity of *Moesziomyces* (Ustilaginales, Ustilaginomycotina) on *Echinochloa* and *Leersia* (*Poaceae*). *MycoKeys; 52*, strony 1-16.

Lilienfeld, F. i Kihara, H. (1934). Genom analyse bei *Triticum* und *Aegilops* von H. Kihara V *Triticum timopheeyi* Zhuk. *Cytologia 6*, strony 87-122.

Lima, G., Ippolito, A., Nigro, F. i Salerno, M. (1997). Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biol Technol.; 10(2)*, strony 169–178.

Limtong, S., Polburee, P., Chamnanpa, T., Khunnamwong, P. i Limtong, P. (2017). *Meira siamensis* sp. nov., a novel anamorphic ustilaginomycetous yeast species isolated from the vetiver grass phylloplane. *Int J Syst Evol Microbiol., 67(7)*, strony 2418–2422.

Lin, Y., Hussain, M., Avery, P., Qasim, M., Fang, D. i Wang, L. (2016). Volatiles from Plants Induced by Multiple Aphid Attacks Promote Conidial Performance of *Lecanicillium lecanii*. *PLoS ONE; 11(3)*, str. e0151844.

Lisiecki, K., Lemańczyk, G., Piesik, D. i Mayhew, C. (2022). Screening Winter Wheat Genotypes for Resistance Traits against *Rhizoctonia cerealis* and *Rhizoctonia solani* Infection. *Agriculture.; 12(12)*, str. 1981.

Liu, F., Hewezi, T., Lebeis, S., Pantalone, V., Grewal, P. i Staton, M. (2019). Soil indigenous microbiome and plant genotypes cooperatively modify soybean rhizosphere microbiome assembly. *BMC Microbiol 19*, strony 1-19.

Liu, H., Able, A. i Able, J. (2021). Priming crops for the future: rewiring stress memory. *Trends in Plant Science*, strony 699-716.

Liu, Y., Zhu, A., Tan, H., Cao, L. i Zhang, R. (2019). Engineering banana endosphere microbiome to improve *Fusarium wilt* resistance in banana. *Microbiome 7*, strony 1-15.

Llorens, E., Sharon, O., Camañes, G., García-Agustín, P. i Sharon, A. (2019). Endophytes from wild cereals protect wheat plants from drought by alteration of physiological responses of the plants to water stress. *Environ. Microbiol., 21*, strony 3299–3312.

Lo Piccolo, S., Alfonzo, A., Giambra, S., Conigliaro, G., Lopez-Llorca, L. i Burruano, S. (2015). Identification of *Acremonium* isolates from grapevines and evaluation of their antagonism towards *Plasmopara viticola*. *Ann Microbiol.; 65*, strony 2393–2403.

Loake, G. i Grant, M. (2007). Salicylic acid in plant defense—the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol.;10(5)*, strony 466-472.

Lombard, L., Houbraken, J., Decock, C., Samson, R., Meijer, M., Réblová, M., . . . Crous, P. (2016). Generic hyper-diversity in *Stachybotriaceae*. *Persoonia; 6*, strony 156-246.

Long, X.-Y., Wang, J.-R., Ouellet, T., Rocheleau, H., Wei, Y.-M., Pu, Z.-E., . . . Zheng, Y.-L. (2010). Genome-wide identification and evaluation of novel internal control genes for Q-PCR based transcript normalization in wheat. *Plant Mol Biol., 74(3)*, strony 307-311.

Lopez-Gomez, M., Sandal, N., Stougaard, J. i Boller, T. (2012). Interplay of flg22-induced defence responses and nodulation in *Lotus japonicus*. *J Exp Bot 63*, strony 393-401.

Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J. i Solano, R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell.;15(1)*, strony 165-178.

Lorito, M., Woo, S., Harman, G. i Monte, E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from proteomics to the field. *Annual Review of Phytopathology, 48*, strony 395–417.

Lu, Z., Gaudet, D., Puchalski, B., Despins, T., Frick, M. i Laroche, A. (2006). Inducers of resistance reduce common bunt infection in wheat seedlings while differentially regulating defence-gene expression. *Physiol. Mol. Plant.; 67*, strony 109-123.

Lucas, J., Hawkins, N. i Fraaije, B. (2015). The Evolution of Fungicide Resistance. *Advances in Applied Microbiology; 90*, strony 29-92.

Luciano-Rosario, D., Keller, N. i Jurick, W. (2020). *Penicillium expansum*: biology, omics, and management tools for a global postharvest pathogen causing blue mould of pome fruit. *Molecular Plant Pathology.; 21*, strony 1391– 1404.

Lugtenberg, B., Caradus, J. i Johnson, L. (2016). Fungal endophytes for sustainable crop production. *FEMS microbiology ecology, 92(12)*, str. fiw194.

Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, C., McLaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., . . .i in.(2004). Assembling the fungal tree of life: Progress, classification, and evolution of subcellular traits. *Am. J. Bot., 91*, strony 1446-1480.

Luyen, V. (2017). Identification of the entomopathogenic fungi sample DL0069 by combination of morphological and molecular phylogenetic analyses. *Vietnam Journal of Science and Technology; 55(1A)*, strony 117–123.

Ma, Y., Miroslav, V. i Freitas, H. (2019). Beneficial microbes alleviate climatic stresses in plants. *Front. Plant Sci.; 10*, str. 595.

Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C. i Freitas, H. (2016). Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *J. Environ. Manag.; 174*, strony 14-25.

Machado, R. i Serralheido, R. (2017). Soil salinity: Effect on vegetable crop growth. Management practices to prevent and mitigate soil salinization. *Horticulturae. 3(30)*, strony 1-13.

Maciá-Vicente, J., Jansson, H., Abdullah, S., Descals, E., Salinas, J. i Lopez-Llorca, L. (2008). Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference to *Fusarium* spp. *FEMS microbiology ecology, 64(1)*, strony 90-105.

Mahoney, A., Yin, C. i Hulbert, S. (2017). Community structure, species variation, and potential functions of rhizosphere-associated bacteria of different winter wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. *Front. Plant Sci.; 8*, str. 132.

Malcolm, G., Kuldau, G., Gugino, B. i Jimenez-Gasco, M. (2013). Hidden host plant associations of soil borne fungal pathogens: Anecological perspective. *Phytopathology; 103*, strony 538-544.

Malik, A., Butt, T., Naqvi, S., Yousaf, S., Qureshi, M., Zafar, M., . . . Iqbal, M. (2020). Lead Tolerant Endophyte Trametes Hirsuta Improved the Growth and Lead Accumulation in the Vegetative Parts of *Triticum aestivum* L. *Heliyon; 6*, str. e04188.

Mandyam, K., Loughin, T. i Jumpponen, A. (2010). Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tallgrass prairie. *Mycologia, 102(4)*, strony 813–821.

Mane, R., Paarakh, P. i Vedamurthy, A. (2018). Brief review on fungal endophytes. *Int. J. Second. Metab. 5*, strony 288-303.

Mańka, K. (1974). Zbiorowiska grzybów jako kryterium oceny wpływu środowiska na choroby roślin. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych; 160*, strony 9-23.

Margalef, R. (1951). Diversidad de Especies en las Comunidades Naturales. *Publicaciones del Instituto de Biologia Aplicada, 6(1)*, strony 59-72.

Marino, A., Nostro, A. i Fiorentino, C. (2009). Ochratoxin A production by *Aspergillus westerdijkiae* in orange fruit and juice. *Int J Food Microbiol.; 132(2–3)*, strony 185-189.

Martínez-Cano, C., Grey, W. i Sands, D. (1992). First report of *Arthrinium arundinis* causing kernel blight on barley. *Plant Dis.; 76*, str. 1077B.

Massoni, J., Bortfeld-Miller, M., Jardillier, L., Salazar, G., Sunagawa, S. i Vorholt, J. (2020). Consistent host and organ occupancy of phyllosphere bacteria in a community of wild herbaceous plant species. *ISME J. 14*, strony 245-258.

Masunaka, A., Hyakumachi, M. i Takenaka, S. (2011). Plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningii* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in the roots of *Lotus japonicus*. *Microbes and environments, 26(2)*, strony 128–134.

Mathre, D., Cook, R. i Callan, N. (1999). From Discovery to Use: Traversing the World of Commercializing BioControl Agents for Plant Disease Control. *Plant Dis.; 83*, strony 972-983.

Mavragani, D. i Abdellatif, L. (2007). First report of damping-off of durum wheat caused by *Arthrinium sacchari* in the semi-arid Saskatchewan fields. *Plant Dis.; 91(4)*, str. 469.

Mazumder, M. D. (2013). Salicylic acid-mediated establishment of the compatibility between *Alternaria brassicicola* and *Brassica juncea* is mitigated by abscisic acid in *Sinapis alba*. *Plant Physiol. Bioch 70*, strony 43-51.

Mbuthia, L., Acosta-Martinez, V., DeBruyn, J., Schaeffer, S., Tyler, D., Odoi, E. i in. (2015). Long term tillage, cover crop and fertilizer effect on microbial community structure, activity: Implication for soil quality. *Soil Biol Biochem.; 89*, strony 24-34.

McFadden, E. i Sears, E. (1946). The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *J. Hered. 37*, strony 81-89.

Meena, M., Gupta, S., Swapnil, P., Zehra, A., Dubey, M. i Upadhyay, R. (2017). *Alternaria* toxins: Potential virulence factors and genes related to pathogenesis. *Front. Microbiol., 8*, str. 1451.

Méndez-Santiago, E., Gómez-Rodríguez, O., Sánchez-Cruz, R., Folch-Mallol, J., Hernández-Velázquez, V., Villar-Luna, E., . . . Wong-Villarreal, A. (2021). *Serratia sp.*, an endophyte of Mimosa pudica nodules with nematicidal, antifungal activity and growth-promoting characteristics. *Archives of microbiology, 203(2)*, strony 549–559.

Menhinick, E. (1964). A Comparison of Some Species-Individuals Diversity Indices Applied to Samples of Field Insects. *Ecology, 45*, strony 859-861.

Micallef, S., Channer, S., Shiaris, M. i Colón-Carmona, A. (2009). Plant age and genotype impact the progression of bacterial community succession in the *Arabidopsis* rhizosphere. *Plant Signal Behav 4*, strony 777-780.

Miedes, E., Vanholme, R., Boerjan, W. i Molina, A. (2014). The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Front. Plant Sci 5:358*, strony 1-13.

Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi. (2021, listopad 12). Pobrano z lokalizacji https://www.gov.pl/web/rolnictwo/integrowana-ochrona-roslin

Mohapatra, D., Kumar, S., Kotwaliwale, N. i Kumar Singh, K. (2017). Critical factors responsible for fungi growth in stored food grains and non-Chemical approaches for their control. *Industrial Crops and Products; 108*, strony 162-182.

Morales Moreira, Z., Helgason, B. i Germida, J. (2020). Crop, genotype, and field environmental conditions shape bacterial and fungal seed epiphytic microbiomes. *Can. J. Microbiol*, strony 161-173.

Morgan, J., Bending, G. i White, P. (2005). Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *J Exp Bot 56*, strony 1729-1739.

Mousa, W. i Raizada, M. (2013). The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: An interdisciplinary perspective. *Front. Microbiol.; 4*, str. 65.

Mónaco, C., Sisterna, M., Perelló, A. i in. (2004). Preliminary studies on biological control of the blackpoint complex of wheat in Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology; 20*, strony 285-290.

Mrówczyński, M. (2013). *Integrowana Ochrona Upraw Rolniczych. t.2*. Poznań: PWRiL.

Müller, M. i Korn, U. (2013). *Alternaria* mycotoxins in wheat – a 10 years survey in the Northeast of Germany. *Food Control.; 34(1)*, strony 191–197.

Murali, T., Suryanarayanan, T. i Geeta, R. (2006). Endophytic Phomopsis species: host range and implications for diversity estimates. *Canadian Journal of Microbiology 52*, strony 673-680.

Murphy, B., Fiona, R., Doohan, M., Trevor, R. i Hodkinson, B. (2018). From concept to commerce, developing a successful fungal endophyte inoculant for agricultural crops. *J. Fungi.; 4*, str. 24.

Muthamilarasan, M. i Prasad, M. (2013). Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *J. Biosci 38*, strony 433-449.

Mysore, K. i Ryu, C. (2004). Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in plant science, 9(2)*, strony 97–104.

Nadeem, S., Ahmad, M., Zahir, Z. i Kharal, M. (2016). Role of Phytohormones in Stress Tolerance of Plants. W: K. Hakeem i M. Akhtar, *Plant, Soil and Microbes* (strony 385–422). Cham: Springer.

Najewski A. (2018). Pszenica ozima, w: Lista opisowa odmian roślin rolniczych 2018. Zbożowe: jęczmień, owies, pszenica, pszenżyto, żyto ozime, kukurydza. Pod redakcją Edward Gacek., Centralny ośrodek Badania odmian roślin uprawnych, Słupia Wielka.

Najewski A. (2019). Pszenica ozima, w: Lista opisowa odmian roślin rolniczych 2019. Zbożowe: jęczmień, owies, pszenica, pszenżyto, żyto, kukurydza. Pod redakcją Edward Gacek., Centralny ośrodek Badania odmian roślin uprawnych, Słupia Wielka.

Najewski A. (2020) Pszenica ozima, w: Lista opisowa odmian roślin rolniczych 2020. Rośliny zbożowe. Pod redakcją Edward Gacek., Centralny ośrodek Badania odmian roślin uprawnych, Słupia Wielka.

Najewski A. (2021). Pszenica ozima, w: Lista opisowa odmian roślin rolniczych 2021. Zboża. Pod red.: Henryk Bujak, Centralny ośrodek Badania odmian roślin uprawnych, Słupia Wielka.

Nakashima, K. i Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013). ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Rep. 32(7)*, strony 959-970.

Natarajan, A. i Sharma, N. (1974). Chromosome banding patterns and the origin of the B genome in wheat. *Genet. Res. 24*, strony 103-108.

Nath, J., McNay, J., Paroda, C. i Gulati, S. (1983). Implication of *Triticum searsii* as the B-genome donor to wheat using DNA hybridizations. *Biochemical genetics, 21(7-8*, strony 745-760.

Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lison, P., Nemri, A. i Harberd, N. (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr Biol.;18(9)*, strony 650-655.

Negi, S., Sukumar, P., Liu, X., Cohen, J. i Muday, G. (2010). Genetic dissection of the role of ethylene in regulating auxin-dependent lateral and adventitious root formation in tomato. *Plant J.;61(1)*, strony 3-15.

Neu, A., Allen, E. i Roy, K. (2021). Defining and quantifying the core microbiome: Challenges and prospects. *PNAS, 118(51)*, str. e2104429118.

Newton, A., Fitt, B., Atkins, S., Walters, D. i Daniell, T. (2010). Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. *Trends Microbiol 18* , strony 365-373.

Nicolaisen, M., Justesen, A., Knorr, K., Wang, J. i Pinnschmidt, H. (2014). Fungal communities in wheat grain show significant co-existence patterns among species. *Fungal Ecol.; 11*, strony 145-153.

Nielsen, L., Jensen, J., Nielsen, G., Jensen, J., Spliid, N., Thomsen, I., . . . Jørgensen, L. (2011). *Fusarium* head blight of cereals in Denmark: Species complex and related mycotoxins. *Phytopathology.; 101*, strony 960–969.

Nilsson, R., Hyde, K., Pawłowska, J., Ryberg, M., Tedersoo, L., Aas, A., . . . in. (2014). Improving ITS sequence data for identification of plant pathogenic fungi. *Fungal Diversity 67*, strony 11–19.

Nirenberg, H. (1976). Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Section Liseola. *Berlin-Dahlem: Mitt Biol Bundesanst für Landund Forstwirt, 169*, strony 1-117.

Nishiyama, R., Watanabe, Y., Leyva-Gonzalez, M., Van Ha, C., Fujita, Y. i Tanaka, M. (2013). *Arabidopsis* AHP2, AHP3, and AHP5 histidine phosphotransfer proteins function as redundant negative regulators of drought stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A.;110(12)*, strony 4840-4845.

Nuangmek, W., Aiduang, W., Kumla, J., Lumyong, S. i Suwannarach, N. (2021). Evaluation of a Newly Identified Endophytic Fungus, *Trichoderma phayaoense* for Plant Growth Promotion and Biological Control of Gummy Stem Blight and Wilt of Muskmelon. *Frontiers in microbiology, 12*, str. 634772.

Nürnberger, T. i Kemmerling, B. (2009). Pathogen-associated molecular patterns (PAMP) and PAMP-triggered immunity. W: *Annual Plant Reviews* (strony 16-47). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.

Nürnberger, T. i Lipka, V. (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology 6*, strony 335-345.

O'Brien, J., Daudi, A., Butt, V. i Paul Bolwell, G. (2012). Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta, 236(3)*, strony 765-779.

O'Donnell, P., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H. i Bowles, D. (1996). Ethylene as a Signal Mediating the Wound Response of Tomato Plants. *Science 274*, strony 1914-1917.

Ofek-Lalzar, M., Gur, Y., Ben-Moshe, S., Sharon, O., Kosman, E., Mochli, E. i Sharon, A. (2016). Diversity of fungal endophytes in recent and ancient wheat ancestors *Triticum dicoccoides* and *Aegilops sharonensis*. *FEMS Microbiol. Ecol., 92*, str. 152.

Okubara, P., Dickman, M. i Blechl, A. (2014). Molecular and genetic aspects of controlling the soilborne necrotrophic pathogens *Rhizoctonia* and *Pythium*. *Plant Sci., 228*, strony 61-70.

Orlandelli, R., Alberto, R., Rubin-Filho, C. i Pamphile, J. (2012). Diversity of endophytic fungal community associated with *Piper hispidum* (*Piperaceae*) leaves. *Genetics and Molecular Research, 11(2)*, strony 1575–1585.

Orozco-Mosqueda, M., Flores, A., Rojas, B., Urtis-Flores, C., Morales-Cedeño, L. i Valencia-Marin, M. (2021). Plant Growth-Promoting Bacteria as Bioinoculants: Attributes and Challenges for Sustainable. *Crop Improvement*, strony 1-15.

Orozco-Mosqueda, M., Rocha-Granados, M., Glick, B. i Santoyo, G. (2018). Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiol Res 208*, strony 25-31.

Otadoh, J., Okoth, S., Ochanda, J. i Kahindi, J. (2011). Assessment of *Trichoderma* isolates for virulence efficacy on *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Tropical and subtropical agroecosystems, 13(1)*, strony 99-107.

Out, B., Boyle, S. i Cheeptham, N. (2016). Identification of fungi from soil in the Nakimu caves of Glacier National Park. *The Journal of Experimental Microbiology & Immunology; 2*, strony 26-32.

Özer, G., Paulitz, T., Imren, M., Alkan, M., Muminjanov, H. i Dababat, A. (2020). Identity and pathogenicity of fungi associated with crown and root rot of dryland winter wheat in Azerbaijan. *Plant Dis., 104*, strony 2149-2157.

Pandey, A., Reddy, M. i Suryanarayanan, T. (2003). ITS-RFLP and ITS sequence analysis of a foliar endophytic *Phyllosticta* from different tropical trees. *Mycological Research 107*, strony 439-444.

Pandey, C., Großkinsky, D., Westergaard, J., Jørgensen, H., Svensgaard, J., Christensen, S., . . . Roitsch, T. (2021). Identification of a bio-signature for barley resistance against *Pyrenophora* teres infection based on physiological, molecular and sensor-based phenotyping. *Plant Sci.; 313*, str. 111072.

Pandey, V., Ansari, M., Tula, S., Yadav, S., Sahoo, R., Shukla, N., . . . Gaur, A. (2016). Dose-Dependent Response of *Trichoderma harzianum* in Improving Drought Tolerance in Rice Genotypes. *Planta, 243*, strony 1251–1264.

Paolacci, A., Tanzarella, O., Porceddu, E. i Ciaffi, M. (2009). Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Mol. Biol., 10*, str. 11.

Park, J., Choi, S.-Y., Hwang, H.-J. i Kim, Y.-B. (2005). Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. *Int. J. Food Microbiol.; 103*, strony 305–314.

Pastor, F. i Guarro, J. (2008). Alternaria infections: laboratory diagnosis and relevant clinical features. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 14(8)*, strony 734-746.

Peralta, H., Mora, Y., Salazar, E., Encarnación, S., Palacios, R. i Mora, J. (2004). Engineering the nifH promoter region and abolishing poly-b -hydroxybutyrate accumulation in *Rhizobium etli* enhance nitrogen fixation in symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Appl Environ Microbiol 70*, strony 3272-3281.

Perdomo, H., Sutton, D., García, D., Fothergill, A., Cano, J. i Gené, J. (2011). Spectrum of clinically relevant *Acremonium* species in the United States. *J Clin Microbiol.; 49*, strony 243–256.

Perello, A., Monaco, C., Moreno, M., Cordo, C. i Simon, M. (2006). The effect of *Trichoderma harzianum* and *T. koningii* on the control of tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) and

leaf blotch (*Mycosphaerella graminicola*) of wheat under field conditions in Argentina. *Biocontrol Science and Technology 16(8),* strony 803-813.

Perelló, A., Moreno, M. i Sisterna, M. (2008). *Alternaria infectoria* species-group associated with black point of wheat in Argentina. *Plant Pathology, 57*, strony 379-379.

Pérez-Cantero, A. i Guarro, J. (2020). *Sarocladium* and *Acremonium* infections: new faces of an old opportunistic fungus. *Mycoses.; 63*, strony 1203–1214.

Perovic, D., Förster, J., Devaux, P., Hariri, D., Guilleroux, M. i Kanyuka, K. (2009). Mapping and diagnostic marker development for soil-borne cereal mosaic virus resistance in bread wheat. *Molecular Breeding 23(4),* strony 641-653.

Petrini, O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. W: J. Andrews i S. Hirano, *Microbial Ecology of Leaves* (strony 179-197). New York: Springer.

Pfaffl, M., Tichopad, A., Prgomet, C. i Neuvians, T. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters; 26*, strony 509-515.

Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie, E. i Hyde, K. (2004). Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? *Fungal Diversity 16*, strony 131-140.

Pieckenstain, F., Bazzalo, M., Roberts, A. i Ugalde, R. (2001). *Epicoccum purpurascens* for biocontrol of *Sclerotinia* head rot of sunflower. *Mycological Research; 105*, strony 77–84.

Plăcintă, D. i Murariu, D. (2016). Fungus Evaluation from seeds germplasm before medium and long term storage. *Cercetări Agronomice în Moldova 49(3),* strony 71-82.

Poling, S., Wicklow, D., Rogers, K. i Gloer, J. (2008). *Acremonium zeae*, a protective endophyte of maize, produces dihydroresorcylide and 7- hydroxydihydroresorcylides. *J Agric Food Chem 56*, strony 3006-3009.

Poole, G., Smiley, R., Walker, C., Huggins, D., Rupp, R., Abatzoglou, J. i in. (2013). Effect of climate on the distribution of *Fusarium spp*. causing crown rot of wheat in the Pacific Northwest of the United States. *Phytopathology.; 103*, strony 1130-1140.

Popiel, D., Kwaśny, H., Chełkowski, J., Stępień, Ł. i Laskowska, M. (2008). Impact of selected antagonistic fungi on *Fusarium* species – toxigenic cereal pathogens. *Acta Mycologica; 43(1).*

Porca, E., Jurado, V., Martin-Sanchez, P., Hermosin, B., Bastian, F., Alabouvette, C. i in. (2011). Aerobiology: an ecological indicator for early detection and control of fungal outbreaks in caves. *Ecol. Indic.; 11*, strony 1594-1598.

Potshangbam, M., Indira Devi, S., Sahoo, D. i Strobel, G. (2017). Functional characterization of endophytic fungal community associated with *Oryza sativa* L. and *Zea mays* L. *Frontier in Microbiology, 8,* str. 325.

Poznańska Hodowla Roślin. (2021, listopad 20). Pobrano z lokalizacji https://phr.pl/produkty/

Prathyusha, P., Sri, A., Ashokvardhan, T. i Prasad, K. (2015). Antimicrobial and siderophore activity of the endophytic fungus *Acremonium sclerotigenum* inhabiting *Terminalia bellerica* Roxb. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.; 30*, strony 84–87.

Qu, Q., Zhang, Z., Peijnenburg, W., Liu, W., Lu, T. i Hu, B. (2020). Rhizosphere Microbiome Assembly and Its Impact on Plant Growth. *J Agric Food Chem 68*, strony 5024-5038.

Racedo, J., Salazar, S., Castagnaro, A. i Díaz Ricci, J. (2013). A strawberry disease caused by *Acremonium strictum*. *Eur J. Plant Pathol., 137*, strony 649–654.

Rai, S., Kashyap, P. i Kumar, S. (2016). Identification, characterization and phylogenetic analysis of antifungal *Trichoderma* from tomato rhizosphere. *SpringerPlus 5*, str. 1939.

Raja, H., Miller, A., Pearce, C. i Oberlies, N. (2017). Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. *J. Nat. Prod., 80*, strony 756-770.

Ramakrishnan, B., Kaur, S., Prasanna, R., Ranjan, K., Kanchan, A. i Hossain, F. (2017). Microbial inoculation of seeds characteristically shapes the rhizosphere microbiome in desi and kabuli chickpea types. *J Soils Sediments 17*, strony 2040-2053.

Ramos Romero, L., Tacke, D., Koopmann, B. i von Tiedemann, A. (2021). First Characterisation of the *Phoma* Species Complex on Maize Leaves in Central Europe. *Pathogens, 10*, str. 1216.

Ranek, M., Stachowski, M., Kirk, J. i Willis, M. (2018). The role of heat shock proteins and co-chaperones in heart failure. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 373*, str. 20160530.

Rascovan, N., Carbonetto, B., Perrig, D., Díaz, M., Canciani, W., Abalo, M., . . . Vazquez, M. (2016). Integrated analysis of root microbiomes of soybean and wheat from agricultural fields. *Scientific reports, 6*, str. 28084.

Rehner, S. i Samuels, G. (1995). Molecular systematics of the *Hypocreales*: a teleomorph gene phylogeny and the status of their anamorphs. *Can J Bot.; 73*, strony 816-823.

Reimer-Michalski, E. i Conrath, U. (2016). Innate immune memory in plants. *Seminars in immunology, 28(4)*, strony 319–327.

Reithner, B., Brunner, K., Schuhmacher, R., Peissl, I., Seidl, V., Krska, R. i Zeilinger, S. (2005). The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genet. Biol.; 42*, strony 749-760.

Reusche, M., Klaskova, J., Thole, K., Truskina, J., Novak, O. i Janz, D. (2013). Stabilization of cytokinin levels enhances *Arabidopsis* resistance against *Verticillium longisporum*. *Mol Plant-Microbe Interact.; 26(8)*, strony 850-860.

Ripa, F., Cao, W., Tong, S. i Sun, J. (2019). Assessment of Plant Growth Promoting and Abiotic Stress Tolerance Properties of Wheat Endophytic Fungi. *BioMed Res. Int., 2019*, strony 1-12.

Rivera-Mendez, W., Fuentes-Alfaro, R., Courrau-López, K., Aguilar-Ulloa, W., Zúñiga-Vega, C. i Brenes-Madriz, J. (2019). Biological control of *Setophoma terrestris* isolated from onion rhizosphere in Costa Rica. *Archives of Phytopathology and Plant Protection; 52(7-8)*, strony 813-824.

Roberti, R., Veronesi, A., Cesari, A., Cascone, A., Di Berardina, I., Bertini, L. i Caruso, C. (2008). Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Sci.; 175*, strony 339-347.

Rodriguez, R., White Jr, J., Arnold, A. i Redman, R. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist, 182*, strony 314-330.

Roger, A., Sandblom, O., Doolittle, W. i Philippe, H. (1999). An evaluation of elongation factor 1 alpha as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Molecular biology and evolution, 16(2)*, strony 218-233.

Rojas, E., Birgit, J., Hans, J., Lyngs, J., Meike, L. i Pilar, E. (2020). Selection of fungal endophytes with biocontrol potential against *Fusarium* head blight in wheat. *Biol. Cont.; 144*, str. 104222.

Rojo, F., Reynoso, M., Ferez, M., Chulze, S. i Torres, A. (2007). Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Protection; 26(4)*, strony 549-555.

Rossmann, M., Pérez-Jaramillo, J., Kavamura, V., Chiaramonte, J., Dumack, K., Fiore-Donno, A., . . .i in.(2020). Multitrophic interactions in the rhizosphere microbiome of wheat: From bacteria and fungi to protists. *FEMS Microbiol. Ecol.; 96*, str. fiaa032.

Rouhier, N., Koh, C., Gelhaye, E., Corbier, C., Favier, F. i Didierjean, C. (2008). Redox based antioxidant systems in plants: biochemical and structural analyses. *Biochimica. Biophysica. Acta.; 1780*, strony 1249–1260.

Rustamova, N., Litao, N., Bozorov, K., Sayyed, R., Aisa, H. i Yili, A. (2022). Plant-associated endophytic fungi: A source of structurally diverse and bioactive natural products. *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol. 23*, strony 1–19.

Saikkonen, K., Faeth, S., Helander, M. i Sullivan, T. (1998). Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics 29*, strony 319-343.

Saikkonen, K., Wali, P., Helander, M. i Faeth, S. (2004). Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends Plant Sci, 9(6)*, strony 275-280.

Salamon, S., Mikołajczak, K., Błaszczyk, L., Ratajczak, K. i Sulewska, H. (2020). Changes in root-associated fungal communities in *Triticum aestivum* ssp. *spelta* L. and *Triticum aestivum* ssp. *vulgare* L. under drought stress and in various soil processing. *PLoS ONE; 15*, str. e0240037.

Sale, V., Aguilera, P., Laczko, E., Madov, P., Berner, A., Zihlmann, U. i in., i. (2015). Impact of conservation tillage and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem.; 84*, strony 38-52.

Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S. i Bhatti, A. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of industrial microbiology & biotechnology, 34(10)*, strony 635–648.

Sallam, N., Ali, E. i Seleim, M. (2021). Endophytic fungi associated with soybean plants and their antagonistic activity against *Rhizoctonia solani*. *Egypt J. Biol. Pest Cont.; 31* , str. 54.

Sanchez-Moral, S., Jurado, V., Fernandez-Cortes, A. i in., i. (2021). Environment-driven control of fungi in subterranean ecosystems: the case of La Garma Cave (northern Spain). *Int. Microbiol.; 24*, strony 573–591.

Sandoval-Denis, M., Gene, J., Sutton, D., Wiederhold, N., Cano-Lira, J. i Guarro, J. (2016). New species of *Cladosporium* associated with human and animal infections. *Persoonia 36*, strony 281-298.

Sanger, F., Nicklen, S. i Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.; 74(12)*, strony 5463-5467.

Sansawal, R., Ahlawat, U. i Priyanka, W. (2017). Role of endophytes in agriculture. *Chem. Sci. Rev. Lett.; 6*, strony 2397-2407.

Santos de França, S., Cardoso, A., Castro Lustosa, D., Soares Ramos, E., Corsi de Filippi, M. i in. (2015). Biocontrol of sheath blight by *Trichoderma asperellum* in tropical lowland rice. *Agronomy for Sustainable Development, 35 (1)*, strony 317-324.

Santoyo, G., Guzmán-Guzmán, P., Parra-Cota, F., de los Santos-Villalobos, S., del Orozco-Mosqueda, M. i Glick, B. (2021). Plant Growth Stimulation by Microbial Consortia. *Agron 11*, str. 219.

Sapkota, R., Jørgensen, L. i Nicolaisen, M. (2017). Spatiotemporal variation and networks in the mycobiome of the wheat canopy. *Front. Plant Sci.; 8*, strony 1-10.

Sapkota, R., Knorr, K., Jørgensen, L., O'Hanlon, K. i Nicolaisen, M. (2015). Host genotype is an important determinant of the cereal phyllosphere mycobiome. *New Phytol.; 207*, strony 1134-1144.

Sardesai, N., Subramanyam, S., Nemacheck, J. i Williams, C. (2005). Modulation of defense-response gene expression in wheat during Hessian fly larval feeding. *J. Plant Interact.; 1*, strony 39-50.

Sarkar, P. i Stebbins, G. (1956). Morphological Evidence Concerning The Origin Of The B Genome In Wheat. *American Journal of Botany, 43*, strony 297-304.

Sarkar, T., Chakraborty, P., Karmakar, A., Saha, A. i Saha, D. (2019). First report of *Periconia macrospinosa* causing leaf necrosis of pointed gourd in India. *J. Plant Pathol., 101*, str. 1281.

Sarma, B., Yadav, S., Singh, S. i Singh, H. (2015). Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Read dressing for enhancing efficacy. *Soil Biol Biochem 87*, strony 25-33.

Sarrocco, S. i Vannacci, G. (2018). Preharvest application of beneficial fungi as a strategy to prevent postharvest mycotoxin contamination: A review. *Crop Protection; 110*, strony 160-170.

Sarrocco, S., Mauro, A. i Battilani, P. (2019). Use of Competitive Filamentous Fungi as an Alternative Approach for Mycotoxin Risk Reduction in Staple Cereals: State of Art and Future Perspectives. *Toxins; 11*, str. 701.

Sax, K. (1922). Sterility in wheat hybrids. II. Chromosome behavior in partially sterile hybrids. *Genetics 7*, strony 513-552.

Sayers, E., Cavanaugh, M., Clark, K., Pruitt, K., Schoch, C., Sherry, S. i Karsch-Mizrachi, I. (2021). GenBank. *Nucleic acids research, 49(D1)*, strony D92–D96.

Schardl, C., Leuchtmann, A. i Spiering, M. (2004). Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annu Rev Plant Biol, 55*, strony 315-340.

Schena, L. i in. (1999). Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biol. Technol.; 17*, strony 189–199 .

Schlatter, D., Yin, C., Hulbert, S. i Paulitz, T. (2019). Core rhizosphere microbiomes of dry land wheat are influenced by location and land use history. *Appl. Environ. Microbiol.; 86*, strony e02135-19.

Schlechter, R., Miebach, M. i Remus-Emsermann, M. (2019). Driving factors of epiphytic bacterial communities: A review. *J Adv Res 19* , strony 57-65.

Schmittgen, T. i Livak, K. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols, 3(6)*, strony 1101–1108.

Scholtz, J. i Visser, B. (2013). Reference gene selection for qPCR gene expression analysis of rust-infected wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology, 81*, strony 22-25.

Schulz, B. i Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycol. Res.; 109*, strony 661-686.

Schulz, B. i Boyle, C. (2006). What are endophytes? W: B. Schulz, C. Boyle i T. Sieber, *Microbial Root Endophytes* (strony 1-10). Berlin: Springer-Verlag.

Schulz, B., Römmert, A., Dammann, U., Aust, H. i Strack, D. (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycological Research 103*, strony 1275-1283.

Segundo, E., Lesemann, D., Martín, G., Carmona, M., Ruiz, L. i Cuadrado, I. (2007). Amaranthus leaf mottle virus: 3′-end RNA sequence proves classification as distinct virus and reveals affinities within the genus Potyvirus. *European Journal of Plant Pathology 117(1)*, strony 81-87.

Selim, K., El-Beih, A., AbdEl-Rahman, T. i El-Diwany, A. (2012). Biology of Endophytic Fungi. *Current Research in Environmental & Applied Mycology, 2*, strony 31-82.

Selosse, M., Baudoin, E. i Vandenkoornhuyse, P. (2004). Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *C R Biol, 327(7)*, strony 639-648.

Shah, F. i Wu, W. (2019). Soil and crop management strategies to ensure higher crop productivity within sustainable environments. *Sustainability 11(1485)*, strony 1-19.

Shah, J. i Zeier, J. (2013). Long-Distance Communication and Signal Amplification in Systemic Acquired Resistance. *Frontiers in Plant Science 4*, str. 30.

Shanmugaiah, V., Balasubramanian, N., Gomathinayagam, S., Monoharan, P. i Rajendran, A. (2009). Effect of single application of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorences* on growth promotion in cotton plants. *Afr. J. Agric. Res., 4(11)*, strony 1220-1225.

Shannon, C. (1948). A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal, 27*, strony 379-423.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N., Wang, J., Ramage, D., . . . Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research, 13(11)*, strony 2498–2504.

Sharma, A., Gupta, A., Dalela, M., Sharma, S., Sayyed, R., Enshasy, H. i Elsayed, E. (2020). Linking Organic Metabolites as Produced by *Purpureocillium lilacinum* 6029 Cultured on Karanja Deoiled Cake Medium for the Sustainable Management of Root-Knot Nematodes. *Sustainability; 12*, str. 8276.

Sharma, N. i Gautam, A. (2019). Early pathogenicity events in plant pathogenic fungi: a comprehensive review. *Biol. Forum Int. J. 11*, strony 24-34.

Sharma-Poudyal, D., Schlatter, D., Yin, C., Hulbert, S. i Paulitz, T. (2017). Long-term no-till: A major driver of fungal communities in dryland wheat cropping systems. *PLoS ONE; 12(9)*, str. e0184611.

Sharon, O., Sun, X., Ezrati, S., Kagan-Trushina, N. i Sharon, A. (2022). The role of vertical and horizontal transmission in the assembly of seed fungal endophyte communities in wheat and wheat wild relatives. str. 517337.

Shoresh, M., Harman, G. i Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual review of phytopathology, 48*, strony 21-43.

Shukla, N., Awasthi, R., Rawat, L. i Kumar, J. (2012). Biochemical and physiological responses of rice (*Oryza sativa* L.) as influenced by *Trichoderma harzianum* under drought stress. *Plant physiology and biochemistry: PPB, 54*, strony 78–88.

Sieber, T. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews 21*, strony 75-89.

Sieber, T. i Grünig, C. (2006). Biodiversity of fungal root-endophyte communities and populations, in particular of the dark septate endophyte *Phialocephala fortinii*. W: B. Schulz, C. Boyle i T. Sieber, *Microbial Root Endophytes* (strony 107-126). Berlin: Springer-Verlag.

Siegel, M., Latch, G. i Johnson, M. (1987). Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Phytopathology 25*, strony 293-315.

Sikora, R., Schäfer, K. i Dababat, A. (2007). Modes of action associated with microbially induced in planta suppression of plant parasitic nematodes. *Australasian Plant Pathology 36*, strony 124-134.

Silver, N., Best, S., Jiang, J. i Thein, S. (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology 7*, str. 33.

Simon, A., Dunlop, R., Ghisalberti, E. i Sivasithamparam, K. (1988). *Trichoderma koningii* produces a pyrone compound with antibiotic properties. *Soil biology and biochemistry; 20(2)*, strony 263-264.

Simonin, M., Dasilva, C., Terzi, V., Ngonkeu, E., Diouf, D., Kane, A., . . . Moulin, L. (2020). Influence of plant genotype and soil on the wheat rhizosphere microbiome: evidences for a core microbiome across eight African and European soils. *FEMS Microbial. Ecol.; 96*, str. fiaa067.

Simón, M., Börner, A. i Struik, P. (2021). Editorial: Fungal wheat diseases: Etiology, breeding, and integrated management. *Front. Plant Sci. 12*.

Singh, N., Singh, A. i Dahiya, P. (2021). Plant growth-promoting endophytic fungi from different habitats and their potential applications in agriculture. W: A. Yadav, *Recent trends in Mycological Research. Fungal Biology.* Cham: Springer.

Skrzypek A. (2018). Pszenica jara, w: Lista opisowa odmian roślin rolniczych 2018. Zbożowe: jęczmień, owies, pszenica, pszenżyto, żyto ozime, kukurydza. Pod redakcją Edward Gacek., Centralny ośrodek Badania odmian roślin uprawnych, Słupia Wielka.

Skrzypek A. (2019). Pszenica jara, w: Lista opisowa odmian roślin rolniczych 2019. Zbożowe: jęczmień, owies, pszenica, pszenżyto, żyto, kukurydza. Pod redakcją Edward Gacek., Centralny ośrodek Badania odmian roślin uprawnych, Słupia Wielka.

Skrzypek A. (2020). Pszenica jara, w: Lista opisowa odmian roślin rolniczych 2020. Rośliny zbożowe. Pod redakcją Edward Gacek., Centralny ośrodek Badania odmian roślin uprawnych, Słupia Wielka.

Skrzypek A. (2021). Pszenica jara, w: Lista opisowa odmian roślin rolniczych 2021. Zboża. Pod red.: Henryk Bujak, Centralny ośrodek Badania odmian roślin uprawnych, Słupia Wielka.

Smiley, R., Gourlie, J., Easley, S., Patterson, L. i Whittaker, R. (2005). Crop damage estimates for crown rot of wheat and barley in the Pacific Northwest. *Plant Dis.; 89*, strony 595-604.

Soares, W. i Porto, M. (2009). Estimating the Social Cost of Pesticide Use: An Assessment from Acute Poisoning in Brazil. *Ecological Economics, 68*, strony 2721-2728.

Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., . . . Youngs, H. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science 306* , strony 2206-2211.

Song, J., Bradeen, J., Naess, S., Raasch, J., Wielgus, S., Haberlach, G., . . . Jiang, J. (2003). Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proc Natl Acad Sci U S A 100*, strony 9128-9133.

Spoel, S., Koornneef, A., Claessens, S., Korzelius, J., Van Pelt, J. i Mueller, M. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate-and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell.;15(3)*, strony 760-770.

Stein, E., Molitor, A., Kogel, K. i 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 physiology, 49(11)*, strony 1747–1751.

Steven, H. i Xinnian, D. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology 12*, strony 89-100.

Stielow, J., Levesque, C., Seifert, K., Meyer, W., Iriny, L., Smits, D. i in., i. (2015). One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi.; 35*, str. 242.

Stone, J., Bacon, C. i White, J. (2000). An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined. W: C. Bacon i J. White, *Microbial Endophytes* (strony 3-29). New York: Marcel Dekker.

Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R. i Schuhmacher, R. (2010). Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of microbiological methods, 81(2)*, strony 187–193.

Strobel, G. (2003). Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection 5*, strony 535-544.

Strobel, G. i Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews 67*, strony 491-502.

Su, L. i Niu, Y. (2018). Multilocus phylogenetic analysis of *Talaromyces* species isolated from cucurbit plants in China and description of two new species, *T. cucurbitiradicus* and *T. endophyticus*. *Mycologia, 110* , strony 357-386.

Su, Z., Zeng, Y., Li, X., Perumal, A., Zhu, J., Lu, X., . . . Lin, F. (2021). The endophytic fungus *Piriformospora indica*-assisted alleviation of cadmium in tobacco. *J. Fungi.; 7*, str. 675.

Suárez-Estrella, F., Arcos-Nievas, M., López, M., Vargas-García, M. i Moreno, J. (2013). Biological control of plant pathogens by microorganisms isolated from agro-industrial composts. *Biological Control; 67*, strony 509-515.

Sudha, V., Govindaraj, R., Baskar, K., Al-Dhabi, N., Duraipandiyan, V., Sudha, V., . . . D. V. (2016). Biological properties of endophytic fungi. *Braz. Arch. Biol. Tech.; 59*.

Sui, L., Li, J., Philp, J. i in. (2022). *Trichoderma atroviride* seed dressing influenced the fungal community and pathogenic fungi in the wheat rhizosphere. *Sci. Rep.; 12*, str. 9677.

Sukmawati, D., Family, N., Hidayat, I., Sayyed, R., Elsayed, E., Dailin, D., . . . Enshasy, H. (2021). Biocontrol Activity of *Aureubasidium pullulans* and *Candida orthopsilosis* Isolated from *Tectona grandis* L. Phylloplane against *Aspergillus sp*. in Post-Harvested Citrus Fruit. *Sustainability; 13*, str. 7479.

Sun, X., Guo, L. i Hyde, K. (2011). Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. *Fungal Divers., 47*, strony 85-95.

Sung, D., Kaplan, F. i Guy, C. (2001). Plant Hsp70 molecular chaperones: Protein structure, gene family, expression and function. *Physiologia Plantarum, 113*, strony 443–451.

Sung, Y., Rahman, N., Shazili, N., Chen, S., Lv, A., Sun, J., . . . MacRae, T. (2018). Non-lethal heat shock induces Hsp70 synthesis and promotes tolerance against heat, ammonia and metals in post-larvae of the white leg shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture; 483*, strony 21-26.

Suryanarayanan, T. (2012). Fungal endosymbionts of seaweeds. *Progress in molecular and subcellular biology 53*, strony 53–69.

Suryanarayanan, T. i Kumaresan, V. (2000). Endophytic fungi of some halophytes from an estuarine mangrove forest. *Mycological Research 104*, strony 1465-1467.

Tadych, M., Bergen, M. i White Jr, J. (2014). *Epichloe spp.* associated with grasses: new insights on life cycles, dissemination and evolution. *Mycologia, 106(2)*, strony 181-201.

Tagne, A., Neergaard, E. i Hansen, H. (2002). Studies of Host—pathogen Interaction between Maize and *Acremonium strictum* From Cameroon. *Eur. J. Plant Pathol., 108*, strony 93–102.

Taheri, A., Hamel, C. i Gan, Y. (2016). Cropping practices impact fungal endophytes and pathogens in durum wheat roots. *Appl. Soil Ecol.; 100*, strony 104-111.

Tan, R. i Zou, W. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports 18*, strony 448-459.

Tandzi, N. i Mutengwa, C. (2019). Estimation of maize (*Zea mays* L.) yield per harvest area: Appropriate method. *Agronomy 10*, str. 29.

Tandzi, N., Mutengwa, C., Ngonkeu, E. i Gracen, V. (2018). Breeding maize for tolerance to acidic soils: A review. *Agronomy 8(84)*, strony 2-21.

Team., R. C. (2021). *R: A language and environment for statistical computing.* Wiedeń, Austria: R Foundation for Statistical Computing, [URL: https://www.R-project.org/].

Tedersoo, L., Nilsson, R., Abarenkov, K., Jairus, T., Sadam, A., Saar, I., . . . Kõljalg, U. (2010). 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytologist 188*, strony 291-301.

Thomma, B., Penninckx, I., Broekaert, W. i Cammue, B. (2001). The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Immunol.; 13*, strony 63-68.

Thompson, J., Higgins, D. i Gibson, T. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research, 22(22)*, strony 4673–4680.

Tian, L., Lin, X., Tian, J., Ji, L., Chen, Y. i Tran, L. (2020). Research advances of beneficial microbiota associated with crop plants. *Int J Mol Sci 21*, strony 1-18.

Tilman, D., Balzer, C., Hill, J. i Befort, B. (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 108*, strony 20260–20264.

Toju, H., Peay, K., Yamamichi, M., Narisawa, K., Hiruma, K., Naito, K., . . .i in. (2018). Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nat. Plants; 4*, str. 247.

Tralamazza, S., Bemvenuti, R., Zorzete, P., Garcia, F. i Corrêa, B. (2016). Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested grains from Brazil. *Food Chem.; 196*, strony 445-450.

Tunali, B., Shelby, R., Morgan-Jones, G. i Kodan, M. (2000). Endophytic fungi and ergot alkaloids in native Turkish grasses. *Phytoparasitica 28*, strony 375-377.

Upson, J., Zess, E., Białas, A., Wu, C. h. i Kamoun, S. (2018). The coming of age of EvoMPMI: evolutionary molecular plant–microbe interactions across multiple timescales. *Curr Opin Plant Biol 44*, strony 108-116.

Vallad, G. i Goodman, R. (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci. 44*, strony 1920-1934.

Valli, P. i Muthukumar, T. (2018). Dark Septate Root Endophytic Fungus *Nectria haematococca* Improves Tomato Growth Under Water Limiting Conditions. *Indian J. Microbiol., 58*, strony 489–495.

van Loon, L., Rep, M. i Pieterse, C. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol.;44*, strony 135-162.

van Overbeek, L., van Vuurde, J. i van Elsas, J. (2006). Application of molecular fingerprinting techniques to explore the diversity of bacterial endophytic communities. W: B. Schulz, C. Boyle i T. Sieber, *Microbial Root Endophytes* (strony 337-350). Berlin: Springer-Verlag.

Vanderwolf, K., Malloch, D. i McAlpine, D. (2019). No Change Detected in Culturable Fungal Assemblages on Cave Walls in Eastern Canada with the Introduction of *Pseudogymnoascus destructans*. *Diversity, 11*, str. 222.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. i Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology 3*, str. RESEARCH0034.

Vargas, L., Santa Brígida, A., Mota Filho, J., de Carvalho, T., Rojas, C., Vaneechoutte, D., . . . Vandepoele, K. (2014). Drought Tolerance Conferred to Sugarcane by Association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: A Transcriptomic View of Hormone Pathways. *PLoS ONE; 9*, str. e114744.

Vega, F., Posada, F., Aime, M., Peterson, S. i Rehner, S. (2008). Fungal endophytes in green coffee seeds. *Mycosystema 27*, strony 75–84.

Vico, I., Gaskins, V., Duduk, N., Vasić, M., Yu, J., Peter, K. i Jurick, W. (2014). First Report of *Penicillium crustosum* Causing Blue Mold on Stored Apple Fruit in Serbia. *Plant disease, 98(10)*, str. 1430.

Vilgalys, R. i Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several Cryptococcus species. *J Bacteriol.; 17*, strony 4238-4246.

Vitti, A., La Monaca, E., Sofo, A., Scopa, A. i in., i. (2015). Beneficial effects of *Trichoderma harzianum* T-22 in tomato seedlings infected by Cucumber mosaic virus (CMV). *BioControl; 60(1)*, strony 135-147.

Vives-Peris, V., de Ollas, C., Gómez-Cadenas, A. i Pérez-Clemente, R. (2020). Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Rep 39*, strony 3-17.

Voigt, K. i Wöstemeyer, J. (2000). Reliable amplification of actin genes facilitates deep-level phylogeny. *Microbiological Research, 155(3)*, strony 179-195.

Vu, D., Groenewald, M., de Vries, M., Gehrmann, T., Stielow, B., Eberhardt, U., . . .i in. (2019). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Stud. Mycol.; 92*, strony 135-154.

Vujanovic, V., Mavragani, D. i Hamel, C. (2012). Fungal communities associated with durum wheat production system: A characterization by growth stage, plant organ and preceding crop. *Crop Prot.; 37*, strony 26-34.

Wachowska, U., Kucharska, K., Jędryczka, M. i Łobik, N. (2013). Microorganisms as biological control agents against *Fusarium* pathogens in winter wheat. *Pol J Environ Stud.; 22(2)*, strony 591–597.

Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K. i Fischer, M. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.; 102*, strony 13386-13391.

Walters, D., Havis, N., Paterson, L., Taylor, J., Walsh, D. i Sablou, C. (2014). Control of foliar pathogens of spring barley using a combination of resistance elicitors. *Front Plant Sci 5*, strony 1-9.

Wang, F., Wu, W., Wang, D., Yang, W., Sun, J., Liu, D. i in., i. (2016a). Characterization and Genetic Analysis of a Novel Light-Dependent Lesion Mimic Mutant, lm3, Showing Adult-Plant Resistance to Powdery Mildew in Common Wheat. *PLoS ONE; 11(5)*, str. e0155358.

Wang, J., Li, T. i Liu, G. (2016b). Unraveling the role of dark septate endophyte (DSE) colonizing maize (*Zea mays*) under cadmium stress: physiological, cytological and genic aspects. *Sci. Rep.; 6*, strony 220-228.

Wang, Z., Chen, Q., Liu, L., Wen, X. i Liao, Y. (2016c). Responses of soil fungi to 5-year conservation tillage treatments in the drylands of northern China. *Appl Soil Ecol.; 101*, strony 132-140.

Waqas, M., Khan, A., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S.-M., Kim, Y.-H. i Lee, I.-J. (2012). Endophytic Fungi Produce Gibberellins and Indoleacetic Acid and Promotes Host-Plant Growth during Stress. *Molecules, 17*, strony 10754–10773.

Wassermann, B., Cernava, T., Müller, H., Berg, C. i Berg, G. (2019). Seeds of native alpine plants host unique microbial communities embedded in cross-kingdom networks. *Microbiome, 7(1)*, str. 108.

Wasternack, C. i Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot.;111(6)*, strony 1021-1058.

Weber, R. i Børve, J. (2021). Infection biology as the basis of integrated control of apple canker (*Neonectria ditissima*) in Northern Europe. *CABI Agric Biosci.; 2*, str. 5.

Wen, F., Wu, X., Li, T., Jia, M., Liu, X., Li, P., . . . Yue, X. (2017). Genome-wide survey of heat shock factors and heat shock protein 70s and their regulatory network under abiotic stresses in *Brachypodium distachyon*. *PLoS ONE, 12*, str. e0180352.

Wennström, A. (1994). Endophyte: The misuse of an old term. *Oikos 71*, strony 535-536.

White Jr, J. i Torres, M. (2010). Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? *Physiol Plant, 138(4)*, strony 440-446.

White, T., Bruns, T., Lee, S. i Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications. 18*, strony 315-322.

Wickel, S., Citron, C. i Dickschat, J. (2013). 2H-Pyran-2-ones from *Trichoderma viride* and *Trichoderma asperellum*. *Eur. J. Org. Chem.*, strony 2906-2913.

Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York: Springer-Verlag; [https://ggplot2.tidyverse.org]. Pobrano z lokalizacji https://ggplot2.tidyverse.org

Wicklow, D., Roth, S., Deyrup, S. i Gloer, J. (2005). A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycol Res 109*, strony 610-618.

Wiewióra, B., Żurek, G. i Pańka, D. (2015). Is the Vertical Transmission of *Neotyphodium lolii* in Perennial Ryegrass the Only Possible Way to the Spread of Endophytes? *PLoS ONE, 10(2)*, str. e0117231.

Wilson, D. (1995). Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos 73*, strony 274-276.

Wright, S., Trakhtenbrot, A., Bohrer, G., Detto, M., Katul, G. i Horvitz, N. (2008). Understanding strategies for seed dispersal by wind under contrasting atmospheric conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A 105*, strony 19084–19089.

Wu, S.-W., Wang, H.-W., Yang, Z.-D. i Kong, L.-R. (2014). Expression Comparisons of Pathogenesis-Related (PR) Genes in Wheat in Response to Infection/Infestation by *Fusarium*, Yellow dwarf virus (YDV) Aphid-Transmitted and Hessian Fly. *Journal of Integrative Agriculture; 13(5)*, strony 926-936.

Xiao, X., Luo, S., Zeng, G., Wei, W. i Wan, Y. (2010). Biosorption of cadmium by endophytic fungus (EF) *Microsphaeropsis sp*. LSE10 isolated from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Bioresour. Technol.; 101*, strony 1668-1674.

Xu, X., Yuan, D., Li, D., Gao, Y., Wang, Z., Liu, Y., . . . Wu, Y. (2018). Identification of stem rust resistance genes in wheat cultivars in China using molecular markers. *PeerJ.; 6*, str. e4882.

Yakti, W., Kovács, G. i Franken, P. (2019). Differential interaction of the dark septate endophyte *Cadophora sp.* and fungal pathogens in vitro and in planta. *FEMS Microbiology Ecology, 95(12)*, str. fiz164.

Yang, H., Ye, W., Ma, J., Zeng, D., Rong, Z., Xu, M., . . . Zheng, X. (2018). Endophytic fungal communities associated with field-grown soybean roots and seeds in the Huang-Huai region of China. *Peer J.; 6*, str. e4713.

Yang, Y., Zuzak, K., Harding, M., Neilson, E., Feindel, D. i Feng, J. (2017). First report of pink root rot caused by *Setophoma* (*Pyrenochaeta*) *terrestris* on canola. *Can J Plant Pathol.; 39*, strony 354-360.

Yao, L., Wang, H., Wan, Z., Li, R. i Yu, J. (2019). The high diversity and variable susceptibility of clinically relevant *Acremonium*-like species in China. *Mycopathologia; 184*, strony 759–773.

Yao, Y., Tian, X., Shen, B., Mao, Z., Chen, G. i Xie, B. (2015). Transformation of the endophytic fungus *Acremonium implicatum* with GFP and evaluation of its biocontrol effect against *Meloidogyne incognita*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology; 31(4)*, strony 549-556.

Yasuda, F., Izawa, H., Yamagishi, D., Akamatsu, H., Kodama, M. i Otani, H. (2006). *Meira nashicola* sp. nov., a novel basidiomycetous, anamorphic yeastlike fungus isolated from Japanese pear fruit with reddish stain. *Mycoscience, 47(1)*, strony 36-40.

Yer, E., Baloglu, M. i Ayan, S. (2018). Identification and expression profiling of all Hsp family member genes under salinity stress in different poplar clones. *Gene, 678*, strony 324–336.

Young, C., Hume, D. i McCulley, R. (2013). Forages and pastures symposium: fungal endophytes of tall fescue and perennial ryegrass: Pasture friend or foe? *J Anim Sci.; 91*, str. 237994.

Yuan, Z., Zhang, C., Lin, F. i Kubicek, C. (2010). Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulate*) from a nature reserve in Yunnan, China. *Appl Environ Microbiol 76(5)*, strony 1642–1652.

Zahoor, M., Muhammad, I., Hazir, R., Muhammad, Q. i Sahib, A. (2017). Alleviation of heavy metal toxicity and phytostimulation of *Brassica campestris* L. by endophytic *Mucor sp*. MHR-7. *Ecotoxicol. Environ. Safety; 142*, strony 139-149.

Zandvakili, N., Zamani, M., Motallebi, M. i Moghaddassi Jahromi, Z. (2017). Cloning, overexpression and in vitro antifungal activity of *Zea Mays* PR10 Protein. *Iran J. Biotechnol. 15*, strony 42-49.

Zarraonaindia, I., Owens, S., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-Marcell, J., Lax, S., . . . Gilbert, J. (2015). The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *mBio, 6(2)*, strony e02527-14.

Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A. i Gullino, M. (2010a). Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. *Biol. Control 54*, str. 172.

Zhang, H., Tang, M., Chen, H., Tian, Z., Xue, Y. i Feng, Y. (2010b). Communities of arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria in the rhizosphere of *Caragana korshinkii* and *Hippophae rhamnoides* in Zhifanggou watershed. *Plant Soil 326*, strony 415-424.

Zhang, J., Jia, W., Yang, J. i Ismail, A. (2006). Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Res. 97(1)*, strony 111-119.

Zhang, S., Gan, Y. i Xu, B. (2016). Application of plant-growth-promoting fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 enhances tolerance of wheat to salt stress through improvement of antioxidative defense system and gene expression. *Front. Plant Sci., 7*, str. 1405.

Zhang, Y., Lubberstedt, T. i Xu, M. (2013). The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. *J. Genet. Genomics 40*, strony 23-35.

Zhao, D., Liu, B., Li, L., Zhu, X., Wang, Y., Wang, J., . . . Chen, L. (2013). *Simplicillium chinense*: a biological control agent against plant parasitic nematodes. *Biocontrol Science and Technology, 23(8)*, strony 980-986.

Zheng, Y., Li, X., Cao, H., Lei, L., Zhang, X., Han, D., . . . Yao, M. (2021). The assembly of wheat-associated fungal community differs across growth stages. *Appl Microbiol Biotechnol.; 105*, strony 7427–7438.

Zhou, D. i Hyde, K. (2001). Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. *Mycological Research 105*, strony 1449-1457.

Zhu, J. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell 167*, strony 313-324.

Zhu, Z., An, F., Feng, Y., Li, P., Xue, L. i Mu, A. (2011). Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.;108(30)*, strony 12539-12544.

Zhu, Z., Hao, Y., Mergoum, M., Bai, G., Humphreys, G., Cloutier, S., . . . He, Z. (2019). Breeding wheat for resistance to *Fusarium* head blight in the Global North: China, USA, and Canada. *Crop J.; 7*, strony 730–738.