

STRESZCZENIE

Bakterie endofityczne to grupa mikroorganizmów, która korzystnie wpływa na wzrost i rozwój roślin. Są one składnikami szczepionek, biostymulantów, biopestycydów i innych środków biokontroli, które wywierają korzystny wpływ na jakość i wydajność plonowania, kondycję gleby i stan środowiska. Dużym zainteresowaniem cieszą się zwłaszcza endofity posiadające wiele cech promujących wzrost roślin. Ich celowe wykorzystanie jako środków kontroli biologicznej jest przyjazną dla środowiska alternatywą dla nawozów chemicznych.

Celem przeprowadzonych badań była analiza mikrobiomu endofitycznego w tkankach liści, korzeni i koleoptyli pszenicy zwyczajnej *Triticum aestivum* L. cv. 'Hondia oraz dwóch odmian pszenicy orkiszowej *Triticum spelta* L. cv. 'Rokosz' i 'Schwabenkorn', uprawianych w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Bioróżnorodność mikrobiomu pszenicy oznaczono metodą niezależną od hodowli mikroorganizmów – sekwencjonowania następnej generacji (NGS). Ponadto wyizolowano i określono właściwości izolatów bakteryjnych do promowania wzrostu i rozwoju pszenicy. Zidentyfikowane szczepy analizowano pod kątem ich zdolności do: produkcji IAA, syntezy enzymów hydrolizujących rozkład celulozy, ksyłanu i białek, produkcji metabolitów przeciwgrzybiczych, oraz detekcji genów odpowiedzialnych za wiązanie azotu cząsteczkowego i syntezę deaminazy ACC.

Analiza metagenomiczna wykazała, że w przypadku roślin uprawianych w warunkach *in vivo*, najbardziej różnorodnymi tkankami pod względem występowania rodzajów bakterii endofitycznych były korzenie pszenicy zwyczajnej 'Hondia' i koleoptyle pszenicy orkiszowej 'Rokosz' i 'Schwabenkorn'. Dominującymi rodzajami bakterii obecnymi we fragmentach badanych roślin były: *Flavobacterium*, *Janthinobacterium*, *Pseudomonas*, *Pedobacter* oraz unclassified_002. W tkankach pszenic pochodzących z kultur *in vitro* to korzenie cechowały się wyższą obfitością występowania rodzajów bakterii w porównaniu z tkankami liści, a mikrobiom dominujący stanowiły: *Pantoea* sp., *Peribacillus* sp., *Bacillus* sp., unclassified_001 i unclassified_041.

Wykonane analizy pozwoliły na uzyskanie 84 szczepów pochodzących zarówno z tkanek roślin uprawianych w warunkach polowych, jak i tych hodowanych *in vitro*. Na podstawie sekwencji fragmentu genu 16S rRNA określono przynależność gatunkową wyizolowanych endofitów. Szczepy uzyskane z tkanek roślin uprawianych w warunkach polowych sklasyfikowano do rodzajów: *Bacillus*, *Serratia*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Rothia*, *Pantoea*, *Microbacterium* i *Curtobacterium*. Izolaty endofityczne wyizolowane z

fragmentów roślin pochodzących z kultur *in vitro* należały do rodzajów: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Brevundimonas*, *Sphingobium*, *Microbacterium*, *Kocuria*, *Pseudomonas* i *Pantoea*.

Rozpoznano też zdolność uzyskanych szczepów endofitycznych do promowania wzrostu i rozwoju pszenicy wykazując, że wśród szczepów wyizolowanych z tkanek roślin uprawianych w warunkach *in vivo* ponad 90% posiadało aktywność ksylanolityczną, celulolityczną i proteolityczną. 63% izolatów syntetyzowało IAA, 48% posiadało w swoim genomie gen *nifH*, a 25% gen *acdS*. Zdolność do produkcji metabolitów o działaniu fungobójczym na grzybnię *Fusarium culmorum* wykazało 10% szczepów, natomiast 5% izolatów wykazało działanie fungobójcze podczas wzrostu *Fusarium graminearum*.

Spośród szczepów uzyskanych z fragmentów roślin pochodzących z kultur *in vitro* wszystkie zdolne były do rozkładu ksylanu i białek mleka, a 92% cechowała aktywność celulolityczna. Zdolność do syntezy IAA potwierdzono u 38% badanych izolatów, zaś gen *nifH* oraz *acdS* posiadało odpowiednio 50% i 42% zidentyfikowanych szczepów. Tylko 4% uzyskanych szczepów endofitycznych wykazało zdolność do produkcji metabolitów o działaniu fungobójczym na grzybnię *F. graminearum* i *F. culmorum*.

Reasumując, w toku realizacji niniejszej pracy wykazano, że scharakteryzowane izolaty endofityczne mają potencjał do promowania wzrostu i rozwoju pszenicy *Triticum aestivum* L. i *Triticum spelta* L. Przedstawione wyniki pozwoliły na poszerzenie wiedzy odnośnie bioróżnorodności mikrobiomu pszenicy zwyczajnej, a także coraz częściej uprawianej w naszym kraju pszenicy orkiszowej. Mając na uwadze potencjał biotechnologiczny endofitów oraz fakt, że w ostatnich latach w rolnictwie systematycznie wzrasta stosowanie różnego rodzaju biopreparatów, zasadnym jest prowadzenie dalszych badań nad mikroorganizmami endofitycznymi. Osiągane rezultaty z pewnością ułatwią opracowanie strategii gwarantujących trwałą intensyfikację produkcji roślinnej w sposób bezpieczny dla środowiska.

SUMMARY

Endophytic bacteria are a group of microorganisms which favorably affect plant growth and development. They are components of vaccines, biostimulants, biopesticides and other biocontrol agents that have a beneficial effect on the quality and productivity of yield and the condition of the soil and the environment. Endophytes with a great deal of features that promote plant growth are especially popular. Their deliberate use as biological control agents is an environmentally friendly alternative to chemical fertilizers.

The aim of this study was to analyze the endophytic microbiome in the tissues of leaves, roots and coleoptiles of common wheat *Triticum aestivum* L. cv. 'Hondia' and two spelt species *Triticum spelta* L. cv. 'Rokosz' and 'Schwabenkorn', grown *in vivo* and *in vitro*. The biodiversity of the wheat microbiome was determined by a method independent of microbial culture – next-generation sequencing (NGS). In addition, the properties of bacterial isolates to promote wheat growth and development were determined. The identified strains were analyzed with regard to their ability to produce IAA, synthesize enzymes that hydrolyze cellulose, xylan and proteins, produce antifungal metabolites, and detect genes responsible for molecular nitrogen fixing and ACC deaminase synthesis.

The metagenomic analysis showed that in the case of plants grown *in vivo*, the most diverse tissues in terms of the occurrence of endophytic bacteria were the roots of the 'Hondia' wheat and the coleoptiles of the 'Rokosz' and 'Schwabenkorn' spelt cultivars. The dominant genera present in the fragments of the tested plants were: *Flavobacterium*, *Janthinobacterium*, *Pseudomonas*, *Pedobacter*, and unclassified_002. In the tissues of wheat from *in vitro* cultures, the roots were characterized by a higher abundance of bacteria genera compared to the tissues of the leaves and the dominant microbiome were: *Pantoea* sp., *Peribacillus* sp., *Bacillus* sp., unclassified_001, and unclassified_041.

The analyzes allowed to obtain 84 strains derived both from plant tissues grown in the field and *in vitro*. The species affiliation of the isolated endophytes was determined on the basis of the sequence of the 16S rRNA gene fragment. The strains obtained from the tissues of plants grown in field conditions were classified into the genera: *Bacillus*, *Serratia*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Rothia*, *Pantoea*, *Microbacterium*, and *Curtobacterium*. Endophytes isolated from plant fragments obtained from *in vitro* cultures belonged to the genera: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Brevundimonas*, *Sphingobium*, *Microbacterium*, *Kocuria*, *Pseudomonas*, and *Pantoea*.

The ability of the obtained endophytic strains to promote the growth and development of wheat was also recognized. It was shown that over 90% of the strains isolated from plant tissues grown *in vivo* had xylanolytic, cellulolytic and proteolytic activity. 63% of the isolates synthesized IAA, 48% had the *nifH* gene in their genome, and 25% had the *acdS* gene. The ability to produce metabolites with a fungicidal effect on the mycelium of *Fusarium culmorum* was demonstrated by 10% of the strains, while 5% of the isolates showed a fungicidal effect during the growth of *Fusarium graminearum*.

All of the strains isolated from plant fragments derived from *in vitro* cultures were capable of decomposing xylan and milk proteins, and 92% had cellulolytic activity. The ability to synthesize IAA was confirmed in 38% of the tested isolates, *nifH* and *acdS* genes were found in 50% and 42% of the identified strains respectively. Only 4% of the obtained endophytic strains showed the ability to produce metabolites with a fungicidal effect on the mycelium of *F. graminearum* and *F. culmorum*.

In conclusion, this study showed that the characterized endophytic isolates have the potential to promote the growth and development of *Triticum aestivum* L. and *Triticum spelta* L. wheat. The results presented in this dissertation allowed to broaden the knowledge of the biodiversity of common wheat and spelled microbiome, which is more and more often cultivated in Poland. Considering the biotechnological potential of endophytes and the fact that the use of various types of biopreparations in agriculture has been systematically increasing in recent years, it is justified to conduct further research on endophytic microorganisms. The results will certainly facilitate the development of strategies that guarantee a sustainable intensification of plant production in an environmentally safe method.