

Kraków, 12.10.2020 r.

Dr hab. Piotr Mleczko
Instytut Botaniki, Wydział Biologii
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
ul. Gronostajowa 3
30-387 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Hanny Jolanty Szmidli zatytułowanej „Wpływ rośliny-gospodarza i warunków glebowych na zbiorowiska ektomykoryz w plantacjach trufli letniej (*Tuber aestivum* Vittad.)”

Przedstawiona do recenzji dysertacja zawiera wyniki trzyletnich badań nad różnorodnością zbiorowisk grzybów ektomykoryzowych wchodzących w symbiozę z dwoma partnerami roślinnymi, dębem szypułkowym oraz leszczyną, prowadzonych na trzech plantacjach trufli letniej w Polsce południowo-wschodniej. W pracy analizie poddano wpływ zarówno samej rośliny symbiotycznej (gospodarza), jak również warunków edaficznych (przede wszystkim glebowych), na wykształcenie zbiorowisk tych grzybów, ze zwróceniem szczególnej uwagi na ektomykoryzy wprowadzonego na drodze inokulacji gatunku - trufli letniej. Badania rozszerzono o wykonane za pomocą najnowszych technik molekularnych analizy zbiorowisk grzybów zasiedlających korzenie drobne, zarówno mykoryzy jak i korzenie niemykoryzowe, dębu i leszczyny na najstarszej z założonych plantacji. Według danych przytaczanych przez Autorkę, praca jest jednym z niewielu opracowań w zakresie podjętej problematyki badawczej, a dotyczących ogrodów truflowych *Tuber aestivum*, wnosi więc nowe dane do zrozumienia funkcjonowania tych sztucznych układów, zwłaszcza w kontekście produkcji owocników trufli. Praca jest o tyle cenna, że dotyczy plantacji trufli, które założone zostały w obszarze suboptymalnym dla tego typu założeń agrotechnicznych, a jej wyniki będą mogły być bardzo dobrym źródłem danych do badań porównawczych dotyczących zmian następujących w polskich trufiarniach w kolejnych latach ich funkcjonowania.

Uwagi formalne

Pracę cechuje standardowy układ. Treść została podzielona na logiczne części (rozdziały i podrozdziały). W dziewięciu rozdziałach przedstawiono: tło pracy (wstęp), cele, zakres i hipotezy badawcze, teren badań, założenia metodyczne i zastosowane metody analizy danych, wyniki, ich dyskusję, wnioski płynące z pracy, cytowaną literaturę. Rozdział prezentujący skróty stosowane w tekście mógłby zostać włączony do metodyki lub poprzedzać wyniki pracy. W ostatnim rozdziale umieszczono załączniki w postaci tabel i wykresów oraz zdjęć.

Tytuł pracy generalnie odzwierciedla jej treść. Można mieć jedynie pewne zastrzeżenia do dyskusji wyników, w której dominują kwestie dotyczące samej trufli letniej bardziej aniżeli zbiorowisk ektomykoryz w plantacji. Również w części wyników dotyczącej wpływu warunków glebowych (skład chemiczny i granulometryczny, odczyn) na mykoryzy uwaga skupiona została jedynie na trufli letniej z pominięciem pozostałych grzybów.

Styl, język pracy, stosowane słownictwo i terminologia

Styl i język pracy są w dużej mierze poprawne. Autorka formułuje myśli w sposób logiczny i zrozumiały, w związku z tym pracę czyta się sprawnie. Pod tym względem wyróżnia się przede wszystkim wstępny rozdział dysertacji, będący interesującym podsumowaniem wiedzy na temat zagadnień, którymi zajmowała się Doktorantka w swojej pracy.

Doktorantce nie udało się jednak uniknąć pewnych błędów stylistycznych, również logicznych, a niekiedy także nieścisłości, których listę przedstawiam poniżej:

- s. 16, w. 16-17 - „Do najważniejszych metod badawczych, które dostarczyć mogą najbardziej pożądaných informacji...” - chodzi o użycie metod badawczych, a raczej o badania z użyciem określonych metod badawczych.
- s. 17, w. 2 - „...mycelium grzybów...” - (1) pleonazm - mycelium to grzybnia, więc zawsze dotyczy grzybów; (2) ponieważ praca jest w języku polskim bardziej poprawne byłoby stosowanie polskiego terminu „grzybnia”.
- s. 21, w. 12-13 - (1) „... niezbędnego do rozwoju węgla” - oczywiście chodzi o węgiel organiczny, co należy doprecyzować, (2) cukry (proste i złożone) są jednym z podstawowych źródeł węgla organicznego, (3) dlaczego w kontekście cukrów pozyskiwanych z materii organicznej Autorka wymienia właśnie mannozę?
- s. 23, w. 3 - źródłosłów terminu **agroleśnictwo** należało podać w miejscu, w którym pojawia się on w tekście po raz pierwszy (s. 16. w. 3).
- s. 27 - skrót myślowy - „W plantacjach truflowych zastosowanie w ostatnich ... latach zaawansowanych metod...” - oczywiście chodzi o **badania** prowadzone w plantacjach, nie zaś o zastosowanie metod w plantacjach.
- s. 27, w. 26 - styl - „... w ramach których wyróżniono...” - poprawniej byłoby „...z których w plantacjach odnaleziono/zidentyfikowano odpowiednio 19 i 11 gatunków”.
- s. 27, w. 34 - skrót myślowy/nieprecyzyjne wyrażenie - „... 15 morfotypów, w tym *Tuber brumale*...” - poprawniej byłoby: „...15 morfotypów, w tym zidentyfikowanych jako *Tuber brumale*...”.
- s. 39, w. 18 - skrót myślowy - „Po wysadzeniu w plantacjach w Chełmie i Pińczowie gleba w rzędach...” - oczywiście chodzi o wysadzenie **sadzonek** w plantacjach.
- s. 54, tab. 4.1 - skrót myślowy - „Taksony grzybów... wyróżnionych w badaniach na podstawie sekwencji...” - poprawniej byłoby: „Taksony grzybów... wyróżnionych w badaniach na podstawie analizy sekwencji...”.
- s. 57 w. 7 - nieprecyzyjny język - „Średnie bogactwo gatunkowe na powierzchniach badawczych...” - bardziej precyzyjnie byłoby: „Średnie bogactwo gatunkowe w pojedynczej próbie na powierzchniach badawczych...”.
- s. 58 w. 1 - nieprecyzyjny język - „W analizowanych zbiorowiskach... najliczniej reprezentowani byli...” - bardziej precyzyjnie brzmiałoby: „W analizowanych zbiorowiskach... największą różnorodnością gatunkową charakteryzowały się rodziny...”. W obecnej formie brzmienia początkowo nie jest jasne, czy chodzi o dominację ilościową w zbiorowisku ektomykoryz czy o różnorodność taksonomiczną, dopiero dane w nawiasach wskazują, że chodzi o to drugie.

s. 58 w. 7 - nieprecyzyjne wyrażenie - „W przypadku pozostałych morfotypów zidentyfikowanych do rodziny...” - nie jest jasne, czy chodzi o morfotypy, których identyfikacja była **możliwa** do poziomu rodziny, czy też chodzi o mykoryzy z pozostałych (innych niż Tuberales i Hymenogastreales) rodzin.

Wydaje się, że dla oszczędności miejsca nie było konieczne podawanie w tekście nazwisk autorów nazw taksonów, które zostały podane w tabeli 4.1.

Tytuł rozdziału 4.1.2 (s. 65) - jak rozumieć określenie „stan mykoryz”? Może to sugerować stan zdrowotny gdy tymczasem chodzi o obfitość i frekwencję.

s. 66 - rycinę 4.4 należało zacytować w paragrafie (paragraf drugi), w którym Autorka opisuje dane zamieszczone na tej rycinie.

W rozdziale 4.1.2 tabele 4.7 i 4.8 należało zacytować na początku rozdziału, ułatwiłoby to czytelnikowi dotarcie do źródła danych.

Tytuły rozdziałów 5.3 i 5.4 są nieprecyzyjne - należałoby doprecyzować parametry na które wpływ mają rośliny-gospodarze (rozdział 5.3) oraz warunki glebowe (rozdział 5.4).

s. 82, tab. 5.1 - nieprecyzyjne wyrażenie - „Zestawienie wyników badań zbiorowisk grzybów...” - w tabeli nie są podsumowane wyniki badań zbiorowisk grzybów, natomiast zestawiono w niej prace, w których opublikowane zostały wyniki badań nad zbiorowiskami grzybów, wraz z informacjami na temat wieku plantacji, gatunków roślin-gospodarzy, metody identyfikacji mykoryz, liczby analizowanych prób oraz liczby odnotowanych gatunków (taksonów?) grzybów.

Uwagi dotyczące kwestii terminologicznych:

s. 21 - Rozdział 1.2.3 Cykl rozwojowy - niekonsekwencja w pisowni obcych terminów określających budowę owocnika:

(1) nie jest wyjaśnione z jakiego języka pochodzą te terminy - są to terminy angielskie pochodzące z łaciny,

(2) w. 10 - *primordium* - powinien zostać zastosowany polski termin: prymordium,

(3) w. 10 - (*askocarp*) - nie jest konieczne wprowadzanie obcego terminu (z błędną pisownią - powinno być: *ascocarp*)

(4) w. 18 - **perydium** (nie: *peridium*) nie jest powierzchnią owocnika, ale jego najbardziej zewnętrzną częścią, zbudowaną z wielu warstw strzępek,

(5) w. 20 - **gleba** jest terminem stosowanym w języku polskim, pochodzi z łaciny (ma taką samą formę w j. angielskim),

(6) w. 24 - niepotrzebne wprowadzenie w nawiasie kursywą terminu **spory** - jeśli Autorka zdecydowała się na przywoływanie terminów obcych to należałoby podać termin **spora** (łac.) lub **spores** (ang.)

Tekst zyskałby na klarowności, gdyby konsekwentnie zastosowano terminologię polską, a terminy (angielskie lub łacińskie) podano w nawiasie, kursywą, z zaznaczeniem języka, z którego pochodzą - podobnie jak to Autorka zrobiła w przypadku innych terminów lub skrótów, np. PCR.

s. 25, w. 33 - użycie słowa **rodzime** w kontekście gatunków występujących naturalnie w danym miejscu jest pewnym nadużyciem - tego terminu używa się na określenie gatunków występujących naturalnie w określonym rejonie/kontynencie (gatunków, które nie zostały wprowadzone sztucznie/zawleczone). Wydaje się, że bardziej prawidłowe byłoby użycie terminu **lokalne**.

s. 26, w. 2 - poprawniejszym terminem w języku polskim od terminu **sklerocjum** jest termin **sklerota**.

s. 27. w. 11 - wydaje się, że wyjaśnienie terminu **redundancja** w stosunku do gatunków grzybów ektomykoryzowych poprzez użycie sformułowania „gatunków jest za dużo w stosunku do potrzeb” nie jest w pełni prawidłowe.

s. 28 - polską nazwą regionu ITS (ang. Internal Transcribed Spacers) nie jest „region zmienny” ale „wewnętrzne sekwencje transkrybowane”. Stosowany jest też termin „przerywniki” ale wydaje się on być rzadziej używany. „Region zmienny” to określenie właściwości tych regionów.

Wydaje się, że precyzyjną nazwą amplifikowanych regionów ITS jest **ITS nrDNA** (nuclear ribosomal DNA) - są to regiony jądrowego rybosomalnego DNA (np. s. 43, w. 10, 12).

s. 62 w. 7 - Poprawne byłoby zdecydowanie się na konkretną wersję i konsekwentne jej stosowanie w przypadku terminów **morfortyp** i **takson**. Kwestie terminologiczne można rozstrzygnąć w rozdziale poświęconym metodyce.

W pracy Autorka nie może się zdecydować na konsekwentne stosowanie terminu **mykoryza** na określenie nie tylko symbiozy pomiędzy grzybami a korzeniami roślin, ale również, w liczbie mnogiej, na określenie bytu składającego się ze strzępek grzyba oraz tkanek korzenia - na określenie tych ostatnich używany jest termin „mykoryzy” (np. tytuł rozdziału 3.2.2, s. 41 w. 20) lub „korzenie mykoryzowe” (np. s. 50 w. 16, s. 51 w. 3-4, w. 7-8). W pewnej mierze jest to zrozumiałe ze względu na trudności w określaniu skomplikowanej rzeczywistości biologicznej, której doświadcza wielu autorów.

Uwagi na temat wstępu oraz celów i hipotez badawczych

Wstęp jest niewątpliwie jednym z najlepszych rozdziałów dysertacji. Autorka bardzo szczegółowo i w oparciu o dobrze dobraną, w większości najnowszą literaturę wprowadza w problematykę podjętych badań.

Moje zastrzeżenia budzi sformułowanie celów pracy. Tytuł dysertacji wprost sugeruje, że głównym celem podjętych badań było poznanie w jakim stopniu i w jaki sposób gatunek rośliny-gospodarza oraz warunki edaficzne kształtują zbiorowiska grzybów ektomykoryzowych w plantacjach trufli letniej (założonych na terenie Polski), a w szczególności na ich różnorodność, bogactwo i skład gatunkowy oraz udział ektomykoryz inokulowanego gatunku trufli. Zatem cele wymienione jako dodatkowe, są w gruncie rzeczy głównymi, podstawowymi celami pracy.

Hipotezy badawcze przedstawiłbym zaraz za celami pracy, ponieważ są z nimi integralnie związane, natomiast zakres pracy umieściłbym jako informację końcową.

Hipoteza 4 - w jaki sposób Autorka definiuje niekorzystny wpływ na strukturę zbiorowisk ektomykoryz? Czy chodzi o obecność gatunków grzybów uznawanych za najbardziej niekorzystne z punktu widzenia uprawy trufli?

Brakuje hipotez dotyczących wpływ warunków edaficznych na całe zbiorowisko grzybów ektomykoryzowych, nie tylko *T. aestivum* (w tytule pracy nie położono nacisku na trufle, ale jest mowa o całym zbiorowisku grzybów ektomykoryzowych).

Uwagi szczegółowe dotyczące Wstępu:

- s. 19, w. 16 - potrzebne źródło do informacji o średnich rocznych temperaturach i sumach opadów w miejscach występowania trufli letniej.
- s. 20, w. 17-18 - czy jest wiadomo jak długo trwa wzrost grzybni trufli letniej w fazie saprotroficznej i co wiadomo na temat właściwości saprotroficznych trufli?
- s. 21 - na początku lub na końcu akapitów, w których zawarte są informacje na temat cech owocników *T. aestivum*, należy podać źródło lub źródła tych informacji - czy wszystkie te informacje pochodzą z pracy Heima (1969) (za wyjątkiem informacji o wysokości siateczki na powierzchni zarodników)?
- s. 35, w. 3 - w tym kontekście można wymienić więcej rodzajów, np. *Russula* i *Lactarius*.
- s. 27, w. 30 - czemu służy poddanie tych dwóch źródeł - Weden i in. 2009, Shamekh i in. 2014 - jeśli na końcu zdania podawane są właściwe źródła literaturowe?
- s. 27, w. 22 - w obydwu mykologicznych bazach danych (mycobank.org i indexfungorum.org) brak jest rodzaju o nazwie *Cyanthus*.
- s. 27, w. 23 - obecna nazwa rodzaju *Pachphloeus* to *Pachyphlodes*.
- s. 27, w. 21 - *Cerrena* nie jest synonimem *Sistotrema* - kilka gatunków umieszczanych kiedyś w rodzaju *Sistotrema* obecnie znajduje się w rodzaju *Cerrena*, jednak nie dotyczy to gatunków ektomykoryzowych (*Cerrena* jest rodzajem obejmującym gatunki saprotroficzne).
- s. 15, przypis - kwestia autorstwa nazwy *T. aestivum* jest skomplikowana. Wg Pacioniego (inf. ustna) opis *Lycoperdon aestivum* Wulfena nie reprezentuje *Tuber* ale prawdopodobnie *Rhizopogon*, natomiast opis Vittadiniego jest jednoznaczny. Dlatego, pomimo nie do końca rozstrzygniętej kwestii priorytetu, *T. aestivum* Vittad. jest zapisem poprawniejszym niż *T. aestivum* (Wulfen) Speg.
- s. 17, w. 14 - „*T. pulchrosporium* sp.nov.” - nowy gatunek został opisany w cytowanej pracy przez jej autorów, w związku z tym prawidłowy sposób podawania nazwy to: *Tuber pulchrosporium* Konstantinidis, Tsampazis, Slavova, Nakkas, Polemis, Fryssouli & Zervakis.

Uwagi na temat terenu badań i metodyki

Powierzchnie objęte badaniami zostały scharakteryzowane szczegółowo i w wystarczającym stopniu.

Moje pytania dotyczą jedynie trzech kwestii:

1. Autorka podaje, że plantacje charakteryzowała przewaga gleb typu rędzina (s. 38, w. 14) - czy na plantacjach stwierdzono również występowanie innych typów gleby, a jeśli tak, to w jaki sposób były one na plantacjach rozmieszczone?
2. Według informacji podanych w pracy Hilszczańskiej i Sieroty (2010), cytowanej w rozdziale, sadzonki inokulowane *T. aestivum* i wysadzone w miejscach zakładania plantacji posiadały już w momencie wysadzania inne ektomykoryzy, co mogło mieć znaczenie dla późniejszego wykształcenia się zbiorowisk grzybów ektomykoryzowych. Czy siewki wysadzone we wszystkich trzech miejscach pochodziły z tej samej szkółki i

czy zatem można założyć, że miały potencjalnie podobny zestaw grzybów ektomykoryzowych towarzyszących trufli letniej?

3. Jakie było pochodzenie inokulum trufli letniej użytego do mykoryzacji sadzonek? Informacja ta odpowiedziałaby na pytanie czy sadzonki wysadzone w poszczególnych plantacjach inokulowane były tym samym czy też potencjalnie różnymi ekotypami trufli letniej, co sugeruje Autorka w rozdziale Dyskusja (s. 97 ostatni akapit).

Uwagi dotyczące metodyki badań

Metody zastosowane w pracy są w generalnie adekwatne do osiągnięcia celów zamierzonych w pracy. Dokładnie podano schematy pobierania prób do badań korzeni, do badań glebowych oraz sposób pozyskiwania danych o temperaturze i wilgotności gleby, i danych klimatyczno-meteorologicznych, co jest dużą zaletą pracy. Również metodyka uzyskiwania danych badawczych oraz metody ich analizy zostały potraktowane szczegółowo. Do tej części dysertacji mam jednak kilka pytań oraz uwag.

Jaką definicję korzeni drobnych przyjęto w pracy? Jest to istotne o tyle, że w różnych źródłach korzenie te definiowane są w różny sposób.

Jak definiowano korzenie autotroficzne? Wydaje się, że termin ten, chociaż funkcjonuje w polskiej literaturze, nie jest poprawny (wszystkie korzenie z definicji są „heterotroficzne”), ale jeśli został użyty to należało podać jego precyzyjną definicję.

Czy klasyfikując mykoryzy jako martwe brano pod uwagę również ich zabarwienia (mykoryzy martwe często przyjmują ciemne zabarwienie)?

Na stronie 42, w. 6, podano informację, że na podstawie cech morfologicznych i w oparciu o Atlas ektomykoryz pod red. Agerera oraz inne źródła (m.in. DEEMY), dokonywano identyfikacji ektomykoryz. W gruncie rzeczy ich nie identyfikowano, a jedynie używano cech morfologicznych do wydzielenia morfotypów i odróżnienia ich od siebie. Również schemat 3.3. nie zawiera informacji o identyfikacji ektomykoryz a jedynie o ich morfotypowaniu (co nie jest tożsame).

Bardzo wskazane byłoby wykonanie analizy wysycenia prób (krzywe refrakcji) i skalkulowanie indeksu Chao1. Pierwsza analiza wskazałaby czy konieczne byłoby dodatkowe próbkowanie w celu wykrycia pełnej różnorodności taksonomicznej na badanych powierzchniach, druga analiza wskazałaby przybliżone bogactwo gatunkowe grzybów.

Nie na wszystkich powierzchniach pobrano ektomykoryzy obydwu drzew: na powierzchni w Pińczowie obecny był jedynie dąb (informacja podana na s. 40, w. 11, zawiera zbyt duże uogólnienie). Czy zatem nie byłoby najbardziej rozsądnym wykluczenie tej powierzchni z analiz i pozostawienie jedynie dwóch powierzchni - przynajmniej jeśli chodzi o analizę wpływu rośliny gospodarza na zbiorowiska grzybów? Szczególnie, że jednocześnie powierzchnia ta była najmłodsza spośród analizowanych. Uwzględnienie prób pobranych spod dębów na powierzchni w Pińczowie znacznie zaburzyło proporcje pomiędzy liczbą prób spod leszczyny oraz liczbą prób spod dębu. O ile stosując odpowiednie metody statystyczne dysproporcje te można częściowo zniwelować w analizach ilościowych, to jednak uwzględnienie tych prób mogło spowodować, że zarówno bogactwo gatunkowe grzybów ektomykoryzowych leszczyny, jak również skład zbiorowisk grzybów z nią związanych, zostały niedoszacowane kosztem dębu.

W rozdziale 3.4 nie zostało jasno sprecyzowane dla jakich danych obliczano współczynniki i wskaźniki ekologiczne (różnorodności i dominacji) - można się jedynie domyślać, że była to pojedyncza próba zbiorcza pobierana spod jednego osobnika rośliny (s. 51, w 10-14).

Warto byłoby doprecyzować tę informację. Podobnie doprecyzowania wymagałaby informacja dla jakich danych obliczane były bogactwo gatunkowe, względna obfitość OTU itd.

W pracy wykonano oddzielne analizy w celu wykazania różnic w badanych parametrach charakteryzujących zbiorowiska grzybów ektomykoryzowych pomiędzy powierzchniami oraz roślinami symbiotycznymi. Takie podejście spowodowało, że do jednej puli włączono dane nie tylko z kilku lat badań ale również dane z powierzchni, które wyraźnie różnią się wiekiem. Dlaczego zatem Autorka nie zdecydowała się na przeprowadzenie analiz wieloczynnikowych, uwzględniających różne zmienne (w tym również lata badań)? Interesującym byłoby stwierdzenie, czy pomiędzy badanymi zmiennymi (powierzchnia, gatunek rośliny, sezon/rok) istnieją interakcje. W interpretacji wyników istotne byłoby również wzięcie pod uwagę, że wiek poszczególnych plantacji był znacząco różny, co ma dość duże znaczenie zwłaszcza na pierwszych etapach rozwoju drzew i związanych z nimi zbiorowisk grzybów.

Problematycznym zagadnieniem jest liczba prób (n) w analizie PCA. W rozdziale dotyczącym metod brak jest informacji jakie dane zostały uwzględnione w analizie. Jak można wnioskować ze sposobu pobierania prób do badań glebowych oraz prób do badań ektomykoryz, w analizie można było jedynie uwzględnić dane zbiorcze dla całej powierzchni. Jaka zatem była realna liczba n i czy na podstawie wykonanych analiz możliwe jest wysnuwanie solidnych wniosków?

Podobny problem występuje w przypadku analizy wpływu czynników takich jak temperatura i wilgotność gleby na parametry mykoryzowe. Ponieważ dane glebowe dotyczyły zbiorczo dla całej powierzchni, tak również należało potraktować dane ektomykoryzowe.

Dlaczego analizie poddano wpływ składu i struktury gleby jedynie na mykoryzy trufli letniej natomiast wpływ temperatury i wilgotności gleby na całość zbiorowiska grzybów mykoryzowych?

Charakter pobierania prób do analiz metagenomowych powoduje, że analizowane były grzyby, które zasiedlały zarówno korzenie niemykoryzowe, jak i mykoryzy żywe oraz (prawdopodobnie, chociaż nie zostało to sprecyzowane) martwe. Dodatkowo, były to grzyby, które związane były z ektomykoryzami/korzeniami w różny sposób: jako endofity, pasożyty tkanek roślinnych, pasożyty grzybów ektomykoryzowych, saprotrofy kolonizujące martwe mykoryzy (?), w końcu przygodne grzyby saprotroficzne rosnące na powierzchni mykoryz czy korzeni. Dlatego wyrażenie „grzyby zasiedlające korzenie dębu/leszczyny” jest stosunkowo mało precyzyjne i powinno być w którymś miejscu wyjaśnione i/lub skomentowane.

Czy, a jeśli tak to w jaki sposób, weryfikowane były nazwy taksonomiczne sekwencji referencyjnych, na podstawie których dokonano identyfikacji morfotypów? O ile w bazie UNITE istnieje kontrola nad nomenklatoryczno-taksonomiczną stroną udostępnianych danych, o tyle w bazie NCBI (GenBank) panuje chaos - taksonomiczne nazwy przypisane sekwencjom mogą być równie dobrze nazwami poprawnymi co nazwami prowizorycznymi, lub nawet nazwami błędnymi, pod którymi wprowadzono sekwencje do bazy, ale nie nazwami ostatecznymi, prawidłowymi. Takie zamieszanie panuje m.in. w przypadku rodzaju *Hymenogaster*. Najbardziej wiarygodne, ale jednocześnie bardzo kłopotliwe, jest sprawdzanie nazw w opublikowanych artykułach źródłowych, najlepiej o charakterze taksonomicznym, z których pochodzą sekwencje referencyjne. Idealną sytuacją jest kiedy korzysta się przy identyfikacji z sekwencji referencyjnych, które pochodzą z analiz typów nomenklatorycznych. Nie stosowanie rygorystycznej selekcji sekwencji referencyjnych i ich nazw prowadzi do publikowania artefaktów.

Uwagi na temat wyników, ich dyskusji oraz wniosków

Badania przeprowadzone przez Doktorantkę dostarczyły szeregu interesujących danych i wyników, które zostały przedstawione szczegółowo w tekście oraz tabelach i na wykresach. Wyniki pracy wymagały komentarza, interpretacji i porównania z danymi uzyskanymi w innych badaniach nad zbiorowiskami ektomykoryzowymi, co podjęła Doktorantka w rozdziale Dyskusja. Każdy Autor ma prawo wyboru drogi prowadzenia dyskusji, wydaje mi się jednak, że ta część pracy została potraktowana nieco pobieżnie. W dyskusji skoncentrowano się głównie na wynikach dotyczących trufli letniej oraz na porównaniach z wynikami badań prowadzonych w ogrodach truflowych tego gatunku przez innych badaczy. W moim przekonaniu dyskusję można było rozszerzyć o prace dotyczące trufiarni z innymi gatunkami *Tuber*, a także w niektórych przypadkach również o prace dotyczące innych układów niż trufiarnie (np. plantacji leśnych, nasadzeń itp.). Poniżej znajduje się kilka bardziej szczegółowych uwag do uzyskanych wyników oraz ich dyskusji.

W związku z tym, że każdy morfotyp był charakteryzowany pod względem cech morfologicznych, a z części morfotypów nie udało się uzyskać sekwencji (a co za tym idzie również identyfikacji molekularnej), wskazanym byłoby umieszczenie w aneksie tabeli z opisami różnicującymi poszczególne morfotypy. Wobec niskiej jakości zamieszczonych w pracy zdjęć morfotypów odróżnienie wielu z nich od siebie jest niemal niemożliwe.

Czy, a jeśli tak to jak często, zdarzała się sytuacja, że jeden morfotyp ektomykoryzy tworzony był przez dwa lub więcej gatunków grzybów?

Bardzo zwraca uwagę niemal całkowity brak korespondencji pomiędzy wynikami badań wykonanych na tej samej powierzchni (Chełm) różnymi metodami: morfotypowania i analizy sekwencji regionu ITS nrDNA oraz analiz NGS opartych na fragmencie ITS1 nrDNA. Ze wszystkich grzybów ektomykoryzowych powtórzyły się jedynie trzy gatunki (!) *Cenococcum geophilum*, *Inocybe pseudoreducta* oraz *Tuber aestivum*. W przypadku wielu pozostałych rodzajów stwierdzono inne gatunki aniżeli wykryte w pierwszej części badań. Czym Autorka tłumaczy tak znacząco różne wyniki uzyskane z zastosowaniem różnych technik? Która z nich wydaje się bardziej wiarygodna?

Nie podano skąd pochodzą numery sekwencji referencyjnych w tabeli 4.1 (GenBank? UNITE?) - należy doprecyzować te informacje.

Według jakich źródeł przyporządkowywano grzyby do grup troficznych (lista OTU zidentyfikowanych do poziomu gatunku, Załącznik 5)? Zaskakujące jest włączenie *Cortinarius hinnuleus* do grzybów o mieszanej naturze troficznej (saprotroficznych i mykoryzowych), podobnie jak dwóch gatunków z rodzajów *Entoloma* i *Peziza* - na jakiej podstawie grzyby z tych rodzaju włączono do grzybów mykoryzowych?

Bardzo przydatne w określaniu statusu troficznego grzybów ektomykoryzowych są prace DeRoman i in. (2005) *Mycol Res* 109:1063-1104, Rinaldi i in. (2008) *Fungal Divers* 33: 1-45, Tedersoo i in. (2010) *Mycorrhiza* 20: 217-263 i Tedersoo & Smith (2013) *Fungal Biol Rev* 3-4: 83-99.

Zaskakująca jest identyfikacja jednej z ektomykoryz jako gatunku z rodzaju *Hypholoma*. Rodzaj maślanka (*Hypholoma*) obejmuje grzyby będące typowymi saprotrofami. Identyfikacja ta mogła być spowodowana faktem, że do analizy wzięto mykoryzy martwe lub obumierające, skolonizowane przez grzybnie *Hypholoma* (patrz również Dyskusja, s. 87 w. 3).

Dlaczego obecność *T. rufum* w plantacji może być uznawane za wskaźnik przyszłego owocnikowania trufli letniej (s. 85 akapit 3)? Jego pojawienie się na plantacji może być

wynikiem losowego i trudnego do przewidzenia transportu zarodników z pobliskich rejonów, nie jest to gatunek inokulowany.

s. 87 w. 26 - wysoka precyzja identyfikacji w metodzie NGS jest dyskusyjna, i zależy od poziomu identyfikacji - im niższy poziom tym precyzja ta może być niższa.

s. 91 w. 23-27 - wyniki uzyskane przez Autorkę nie mogą potwierdzać tezy, że „tylko spokrewnione ze sobą gatunki roślin-gospodarzy (należące do jednego rodzaju) charakteryzują się podobnymi zbiorowiskami GEM”.

Tłumaczenie wyższego poziomu mykoryzacji korzeni leszczyny w porównaniu z dębem faktem, że ma ona płytszy system korzeniowy (s. 92 akapit 3), wydaje się być dość ryzykowne. Mykoryzy tworzone są przede wszystkim w górnej warstwie gleby, niezależnie od tego jak głęboko sięga cały system korzeniowy. Natomiast bardziej prawdopodobne wydaje się drugie wytłumaczenie, które bierze pod uwagę szybkość wzrostu i wymiany korzeni drobnych leszczyny w porównaniu z dębem.

Skąd bierze się przekonanie Autorki o większej atrakcyjności leszczyny, jako gatunku pionierskiego, dla kolonizacji przez grzyby ektomykoryzowe? Jakie cechy leszczyny (oprócz wspomnianych wyżej) mogą wpływać na to, że jej korzenie są być może łatwiej/szybciej kolonizowana przez grzyby?

s. 93, w. 25-26 - Z pewnością wymieszanie sadzonek dębu i leszczyny wpłynęło na bardziej równomierne wykształcenie warunków edaficznych, zmniejszenie wpływu pojedynczej rośliny-gospodarza na zbiorowiska grzybów glebowych, ale nie wyeliminowało całkowicie efektu wpływu rośliny-gospodarza na te zbiorowiska, zwłaszcza zbiorowiska grzybów ektomykoryzowych. Stąd może byłoby sensowne oddzielenie w analizach danych dotyczących grzybów ektomykoryzowych od danych dotyczących innych grup grzybów (?)

Oprócz czynnika geograficznego (odległość pomiędzy plantacjami), w kształtowaniu zbiorowisk grzybów ektomykoryzowych na plantacjach duży wpływ miały na pewno:

1. wiek drzew/krzewów - rozpiętość od 3 lat na plantacji w Pińczowie (dwuletniej w momencie rozpoczęcia badań), poprzez 5 lat na plantacji w Olkuszu (czteroletniej w momencie rozpoczęcia badań), aż po 8 lat na plantacji w Chełmie (ośmioletniej w momencie rozpoczęcia badań);
2. obecność źródła inokulum w postaci lasów w bliskim sąsiedztwie dwóch plantacji (Chełm, Pińczów) i jego brak w pobliżu plantacji w Pińczowie.

Wydaje się, że również te czynniki dobrze byłoby wziąć pod uwagę interpretując wyniki badań.

Strona ilustracyjna pracy

Zamieszczone w pracy zdjęcia i schematy dobrze ilustrują omawiane treści i stanowią cenne uzupełnienie tekstu. Dane zostały przedstawione w tabelach i wykresach, których liczba i zakres w moim przekonaniu w większości są wystarczające.

Szkoda, że Autorka nie umieściła w pracy zdjęć poszczególnych powierzchni badawczych. Na stronie 16 znajduje się jedynie zdjęcie ilustrujące wygląd powierzchni w Chełmie (ryc. 1.3), jednak bez podania roku, w którym wykonano fotografię.

Zastrzeżenia budzi jakość zdjęć przedstawiających wyróżnione morfotypy ektomykoryz - użyte powiększenia, kolorystyka zdjęć i ich rozdzielczość nie pozwalają na dostrzeżenie różnic pomiędzy wieloma morfotypami. W tabeli brak jest informacji z korzeni którego drzewa pochodzą sfotografowane ektomykoryzy.

Ryc. 1.4 - rycina przedstawia drzewo filogenetyczne rodzaju *Tuber*, nie rodziny Tuberaceae.

Uwagi końcowe

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska wnosi interesujące dane do wiedzy o funkcjonowaniu zbiorowisk grzybów ektomykoryzowych w plantacjach trufli letniej w Polsce, a jej wyniki mogą mieć również aspekt praktyczny.

Za najważniejsze osiągnięcia badań przeprowadzonych przez Doktorantkę w ramach niniejszej rozprawy uważam:

1. Szczegółową analizę zbiorowisk grzybów ektomykoryzowych towarzyszących trufli letniej w trzech ogrodach truflowych w Polsce.
2. Stwierdzenie i zbadanie charakteru różnic w zbiorowiskach grzybów ektomykoryzowych związanych z dwiema roślinami-gospodarzami (dębem i leszczyną).
3. Wskazanie czynników edaficznych, które mogą kształtować zbiorowiska grzybów ektomykoryzowych w trufierniach oraz udział mykoryz inokulowanego gatunku (trufli letniej) w tych zbiorowiskach.
4. Przeprowadzenie po raz pierwszy analizy zbiorowisk grzybów związanych z korzeniami drobnymi w trufierniach *T. aestivum* w Polsce za pomocą badań NGS.

Wymienione w recenzji uchybienia oraz uwagi i komentarze do pracy mają w dużej mierze charakter polemiczny i nie zmieniają mojej ogólnej pozytywnej oceny dysertacji.

Konkluzja

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Hanny Jolanty Szmidli, pt. „Wpływ rośliny-gospodarza i warunków glebowych na zbiorowiska ektomykoryz w plantacjach trufli letniej (*Tuber aestivum* Vittad.)”, spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Badawczego Leśnictwa w Sękocinie Starym o dopuszczenie Pani mgr Hanny Jolanty Szmidli do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

