

Streszczenie

Polska jest jednym z kluczowych producentów truskawki na świecie - w 2020 roku powierzchnia pod uprawę tego owocu zajmowała ponad 30 000 hektarów i była mniejsza jedynie od tej w Chińskiej Republice Ludowej. Polska produkuje niemal 200 000 ton owoców truskawek rocznie, ustępując w Europie jedynie Hiszpanii i plasując się zaraz przed Niemcami. Co warto również zauważyć, Polska jest liderem w produkcji ekologicznej truskawki w Europie i na świecie.

Rolnictwo ekologiczne nabiera w ostatnich latach coraz większego znaczenia - Unia Europejska przedstawiła w 2020 roku strategię 'od pola do stołu' (ang. Farm to Fork Strategy), która wchodzi w skład Europejskiego Zielonego Ładu (ang. European Green Deal). Strategia ta zakłada znaczne zmniejszenie zużycia chemicznych środków ochrony roślin, w tym fungicydów i pestycydów, przy jednoczesnym zwiększeniu udziału rolnictwa ekologicznego. Należy jednak pamiętać, że ekologiczny sposób produkcji żywności wymaga wykluczenia wielu nawozów mineralnych i środków ochrony roślin, co znacznie utrudnia utrzymanie zdrowej plantacji, jak i wysokich plonów. Dodatkowo, owoce truskawki charakteryzują się delikatną ścianą komórkową, która może być w łatwy sposób spenetrowana przez patogeny, co przyczynia się do obniżenia plonów i ich jakości. Dlatego też, niezbędnym działaniem w rolnictwie jest szybkie i skuteczne monitorowanie upraw pod kątem występowania patogenicznych mikroorganizmów, w celu użycia wycelowanych działań ochronnych, jeszcze przed rozprzestrzenieniem się chorób na plantacji. Dodatkowo, scharakteryzowanie różnic pomiędzy zdrowymi oraz porażonymi plantacjami, pozwoli na opracowanie skutecznych rozwiązań, w tym biopreparatów oraz strategii produkcji, które mogą zwiększyć zdrowotność i produktywność upraw owoców miękkich w zrównoważony sposób.

Klasyczne metody identyfikacji czynnika patogennego atakującego plantacje owoców, skupiają się głównie wokół rozpoznania objawów chorobowych na roślinach, bądź obserwacji cech morfologicznych czystych szczepów wyizolowanych z porażonych części roślin patogenów na pożywkach mikrobiologicznych oraz pod mikroskopem. Co ważne, identyfikacja czynnika chorobotwórczego przeprowadzona w taki sposób, jest czasochłonna oraz w dużej części przypadków niedokładna i może powodować wdrożenie nieodpowiednich środków ochrony plantacji, co niepotrzebnie obciąża środowisko i jest niekorzystne ekonomicznie.

W niniejszej rozprawie doktorskiej zebrano najważniejsze informacje dotyczące charakterystyki, opracowanych wcześniej, obecnych w światowej literaturze naukowej, metod molekularnej detekcji kluczowych patogenów truskawek - grzybów *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Verticillium* spp. oraz grzybopodobnych lęgniowców z rodzaju *Phytophthora*, oraz zagrożeń dla rolnictwa i produkcji żywności powodowanych przez te fitopatogeny.

W dalszej części badań zoptymalizowano oraz wykazano przydatność molekularnych metod detekcji wymienionych kluczowych patogenów truskawki w celu rozpoznania czynnika chorobotwórczego na plantacjach ekologicznych. W tym celu opracowano oraz zoptymalizowano metody oparte o techniki łańcuchowej reakcji polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym - real-time Polymerase Chain Reaction (real-time PCR) oraz izotermicznej reakcji amplifikacji wykorzystującej zapętlenie - Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), do których zaprojektowano sekwencje odpowiednich markerów

molekularnych, zoptymalizowano stężenia odczynników reakcji oraz profil temperaturowy, zapewniając - 6 - optymalny przebieg reakcji i skuteczną detekcję. Metody te zwalidowano na materiale genetycznym pochodzącym zarówno z czystych szczepów patogenów, wyizolowanych z porażonych części roślin truskawki, jak również na całkowitym DNA wyizolowanym z próbek środowiskowych (gleba, części nadziemne roślin oraz owoce). Dla opracowanej reakcji real-time PCR limit detekcji wynosił 39 fg/ μ L dla patogenów z rodzaju *Botrytis* oraz *Verticillium*, natomiast dla *Colletotrichum* spp. - 156 fg/ μ L. Z kolei limit detekcji opracowanej reakcji LAMP wynosił 3 pg/ μ L dla *Phytophthora* spp. oraz 300 fg/ μ L dla *Phytophthora cactorum*, co świadczy o wysokiej czułości zoptymalizowanych metod.

W kolejnym etapie niniejszych badań wykorzystano również sekwencjonowanie następnej generacji Illumina Sequencing-by-Synthesis (SBS) oraz analizy bioinformatyczne przeprowadzone w językach programowania R, Python oraz C++, które pozwoliły na scharakteryzowanie mykobiomu gleby, ryzosfery, korzeni oraz części nadziemnych truskawki oraz na określenie różnic w strukturze mikroorganizmów grzybowych plantacji zdrowych oraz porażonych.

słowa kluczowe: rolnictwo ekologiczne, metody detekcji fitopatogenów, reakcja łańcuchowa polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym, izotermiczna reakcja polimerazy wykorzystująca zapętlanie, sekwencjonowanie Illumina dzięki syntezie, mykobiom.