

Dr hab. Aleksandra Obrępańska-Stęplowska, prof. IOR-PIB  
Zakład Biologii Molekularnej i Biotechnologii  
Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy  
w Poznaniu

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Dominiki Siegiedy  
pt.: „Opracowanie metod detekcji wybranych patogenów owoców miękkich z  
wykorzystaniem technik biologii molekularnej”  
wykonanej w Instytucie Agrofizyki in. Bohdana Dobrzańskiego, Polskiej Akademii Nauk**

Rozprawę doktorską pani mgr inż. Dominiki Siegiedy wykonaną w Instytucie Agrofizyki PAN stanowi 266 stron, rozpoczynają ją oświadczenia Doktorantki oraz promotorów, informacja o finansowaniu badań, streszczenia w języku polskim i angielskim, spis treści i symboli oraz lista publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, a kończy życiorys naukowy, spis dokonań pani mgr inż., a także oświadczenia współautorów o ich wkładzie w powstanie publikacji. Na rozprawę składa się cykl trzech recenzowanych publikacji naukowych, w tym jedna praca przeglądowa oraz dwie oryginalne prace dotyczące opracowania i optymalizacji technik diagnostycznych do wykrywania grzybów patogennych.

- 1) **Malarczyk D.** (obecnie: Siegieda), Panek J., Frąc M., 2019. Alternative Molecular-Based Diagnostic Methods of Plant Pathogenic Fungi Affecting Berry Crops—A Review. *Molecules* 24, 1200.

wskaźnik Impact Factor2019: **3,267**; punktacja MEiN: **140** punktów.

- 2) **Malarczyk D.** (obecnie: Siegieda), Panek J., Frąc M., 2020. Triplex Real-Time PCR Approach for the Detection of Crucial Fungal Berry Pathogens—*Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp.. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 8469.

wskaźnik Impact Factor2020: **5,924**, punktacja MEiN: **140** punktów.

- 3) **Siegieda D.**, Panek J., Frąc M., 2021. “Shining a LAMP” (Loop-Mediated Isothermal Amplification) on the Molecular Detection of Phytopathogens *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* in Strawberry Fields. *Pathogens* 10, 1453.

wskaźnik Impact Factor2021: **4,531**

Uzupełnieniem ww. prac jest manuskrypt kolejnej publikacji, w której Autorka poszerzyła swoje badania o pogłębioną charakterystykę struktury mikroorganizmów grzybowych w ekologicznych uprawach truskawek.

- 4) **Siegieda D.**, Panek J., Frąc M., Plant and soil health in organic plantations of strawberry - mycobiome biodiversity, fungal trophic modes and networks.

Wymienione prace są współautorskie, a pani mgr inż. Dominika Siegieda jest pierwszym autorem. W pracach tych uczestniczyła w opracowaniu koncepcji, zebraniu materiału badawczego, wykonaniu prac eksperymentalnych, analizie danych oraz przygotowaniu manuskryptów.

Autorka podejmuje ważne badania dotyczące struktury mykobiomu oraz diagnostyki molekularnej ważnych, również z ekonomicznego punktu widzenia, patogenów grzybowych, w tym *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Verticillium* spp oraz grzybopodobnych lęgniowców z rodzaju *Phytophthora* w uprawach ekologicznych truskawki. Praca powstała w bardzo dobrym zespole Zakładu Badań Systemu Gleba-Roślina pod kierunkiem pani prof. Magdaleny Frąc.

Badania zostały sfinansowane w ramach projektu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju BIOSTRATEG3/344433/16/NCBR/2018 pt.: „Nowe rozwiązania biotechnologiczne w diagnostyce, zwalczaniu i monitoringu kluczowych patogenów grzybowych w ekologicznej uprawie owoców miękkich”. Ta informacja ma istotne znaczenie dla charakteru przedstawionej rozprawy, która w dużej mierze dotyczy opracowania praktycznych rozwiązań diagnostycznych, a które mogą być użyteczne dla monitorowania stanu fitosanitarnego ekologicznych upraw owoców miękkich, w szczególności truskawki. Rozprawa zawiera również bardzo wiele elementów o charakterze badań podstawowych, o dużym stopniu nowatorstwa.

Publikacje oraz manuskrypt będące główną częścią rozprawy poprzedza 48 stron, na które składają się 1) Wprowadzenie 2) Hipotezy badawcze oraz cel rozprawy doktorskiej, 3) Omówienie wyników publikacji oraz badań uzupełniających, 4) Podsumowanie i 5) Wnioski. W mojej opinii zarówno „Wprowadzenie”, jak i „Omówienie wyników publikacji oraz badań uzupełniających” mogły być skrócone, gdyż w stosunkowo dużej mierze powtarzają informacje z dalszych części rozprawy lub dotyczą szczegółowego opisu metod dosyć dobrze już poznanych i wykorzystywanych standardowo w pracach dotyczących np. diagnostyki molekularnej. Część wprowadzająca dobrze obrazuje i wyjaśnia podjęcie tematyki badawczej, zwłaszcza w kraju, który ma silną pozycję w produkcji owoców, w tym truskawek, jak również ma ambicje poszerzać areał upraw ekologicznych. Autorka przedstawia informacje dotyczące istniejących zagrożeń dla produkcji żywności, ze szczególnym naciskiem na wspomniane wcześniej patogeny. Dosyć szeroko również opisuje metody wykorzystywane w diagnostyce molekularnej patogenicznych grzybów i lęgniowców oraz wybrane metody bioinformatyczne wykorzystywane w analizie danych pozyskanych z sekwencjonowania wysokoprzepustowego. W tej części Autorka rozprawy nie uniknęła szeregu błędów, ale głównie o charakterze edytorskim. Niektóre z nich wynikają z nieustalonej wersji tłumaczenia niektórych technik badawczych lub zwrotów z języka angielskiego, w wyniku czego pojawiają się tu zwroty potocznie stosowane wśród osób pracujących w naukach eksperymentalnych. Przykładowo, w metodzie LAMP wykorzystuje się polimerazę z aktywnością do wypierania (a nie zamiany nici), zamiast sformułowania „wymaga mniejszych ilości wejściowego DNA” powinno się użyć „mniejszego początkowego stężenia DNA”. Podobnie słowo „terminuje” (str. 24) czy „primery” (str. 25) mają swoje polskie odpowiedniki. Innym przykładem są nie do końca precyzyjne sformułowania – np. „metoda Illumina SBS (ang. sequencing-by synthesis) (...) pozwala, po analizach bioinformatycznych na scharakteryzowanie całego mikrobiomu obecnego w danej próbce”. Warto tutaj było dodać przysłówkę „potencjalnie”, gdyż na obecnym etapie wiedzy naukowej, charakterystyka całego mikrobiomu próbki spotyka pewne ograniczenia. Również warto podkreślić, że słowo mikrobiom obejmuje ogół mikroorganizmów, a mykobiom jest częścią mikrobiomu (str. 26).

Autorka postawiła przed sobą weryfikację 7 hipotez badawczych. Dwie z nich są dosyć oczywiste (nr 1 i 3) natomiast kolejne zostały bardzo dobrze sformułowane, podobnie jak postawione cele rozprawy – cel ogólny oraz cele szczegółowe. Tu jednak również zwracam uwagę na nie do końca precyzyjne określenie jednej z metod – mianowicie „metody wielokrotnej reakcji łańcuchowej”. Oczywiście metoda PCR już w założeniu dotyczy reakcji zachodzących wielokrotnie, dlatego lepszym określeniem byłoby użycie określenia metody wykrywającej więcej niż jeden patogen – metodą „jednoczesnej detekcji”/ „jednoczesnego wykrywania”, ewentualnie pozostawienie tutaj zwrotu angielskiej nazwy („reakcji typu multiplex”).

W omówieniu wyników również pojawiają się zwroty, które można zastąpić mniej potocznymi, a przy okazji bardziej precyzyjnymi stwierdzeniami. Przykładem jest, cytuję „jednym z nich jest poligalakturonaza, której wielkość produkcji jest związany ze stopniem patogenności grzyba”. Tu oczywiście można było przedstawić wyniki (lub zacytować publikację), które wskazują na związek poziomu ekspresji genu poligalakturonazy i patogenności grzyba. Również nie do końca jest jasne, co Doktorantka chciała przekazać pisząc, cytuję: „*Botrytis cinerea*, powodujący szarą pleśń, atakuje nie tylko truskawki i maliny, ale również ponad 500 różnych gatunków roślin, co czyni ją drugim najpoważniejszym patogenem w biologii molekularnej w 2012 roku”?

Najważniejszą część rozprawy stanowią 3 publikacje z czasopism indeksowanych w międzynarodowych bazach danych oraz jeden załączony, nieopublikowany manuskrypt. Pierwsza praca, przeglądowa, jest ciekawą analizą metod diagnostycznych wykorzystywanych do identyfikacji patogenów, którym poświęcona jest dysertacja. Najbardziej wartościowy w mojej ocenie jest przegląd genów markerowych, wykorzystywanych w diagnostyce grzybów i lęgniowców, pokazujący bardzo duży ich zakres o udowodnionej przydatności do takich celów. Praca jest dodatkowo bogato ilustrowana dzięki załączeniu szeregu zdjęć kolonii gatunków grzybów oraz lęgniowca na pożywkach hodowlanych. Praca została już zrecenzowana przez zewnętrznych recenzentów, natomiast ja ze swojej strony chciałam dodać, że na pewno wzbogaciłyby ją zdjęcia objawów chorobowych wywołanych przez analizowane patogeny na (przynajmniej wybranych) roślinach oraz uzupełnienie tabel o gospodarzy roślinnych, na których prowadzono badania w cytowanych pracach. Również włączenie techniki LAMP do tabel byłoby dobrym rozwiązaniem. Są to jednak tylko uwagi o charakterze edytorskim.

Kolejne dwie prace dotyczą opracowania protokołów diagnostycznych, metody triplex real-time PCR oraz LAMP, do wykrywania badanych w dysertacji patogenów. Metody zostały zoptymalizowane i przetestowane na próbkach środowiskowych. Należy podkreślić, że poza samym opracowaniem ww. technik, Doktorantka podjęła się szerszej analizy występowania patogenów grzybowych w analizowanych uprawach – np. w pierwszej pracy, w której opracowała technikę real-time PCR przeanalizowała ją także na 244 próbkach pobranych z ryzosfery, gleby, korzeni, owoców oraz części naziemnych roślin zebranych na ekologicznych plantacjach truskawek. Dodatkowo analizowała je dla 8 odmian truskawek oraz dla różnych typów gleby. Ponadto poprzez sekwencjonowanie markera D2LSU zidentyfikowała występowanie szeregu innych, niż docelowe (*Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp., *Verticillium* spp.) rodzajów grzybów występujących w uprawach ekologicznych. Jest to bardzo cenny

materiał, który może posłużyć Doktorantce w przyszłości do przeprowadzenia dalszych analiz, w tym dynamiki zmian w strukturze mykobiomu upraw ekologicznych oraz jej powiązań z patogenezą wywołaną wybranymi gatunkami grzybów. Podobnie w przypadku opracowania metody LAMP do wykrywania *Phytophthora cactorum* i *Phytophthora* spp., Doktorantka przetestowała metodę na 348 próbkach środowiskowych, oceniając na ich podstawie występowanie w uprawach ekologicznych lęgniowca *Phytophthora* spp.

W przypadku publikacji nr 2 dotyczącej opracowania metody real-time PCR pojawia się pytanie, czy została przeprowadzona analiza wydajności reakcji? Ciekawa byłaby również dyskusja limitu detekcji grzyba *Colletotrichum* w kontekście jego wykrywania w sztucznie zanieczyszczonych próbkach?

Najbardziej wartościową i zawierającą najwięcej ciekawych wyników jest ostatnia część rozprawy, czyli manuskrypt zawierający informacje uzupełniające, w którym Doktorantka podjęła się szeregu analiz na podstawie sekwencjonowania następnej generacji (Illumina Sequencing-by-Synthesis) ITS1 grzybów. Pani mgr inż. Siegieda sformułowała ciekawe hipotezy, pierwszą – dotyczącą niższego poziomu alfa-różnorodności mykobiomu porażonych roślin truskawki od tego u roślin zdrowych oraz drugą hipotezę, w której założyła, że głównymi czynnikami wpływającymi na skład mykobiomu są grzyby należące do poziomu troficznego patotrofów. Analiza wyników badań wykazała, że poziom alfa-różnorodności zbiorowisk grzybów był wyższy w przypadku plantacji zdrowych tylko w próbkach pobranych z korzeni roślin, natomiast niższy w próbkach pobranych z gleby. Natomiast w przypadku drugiej hipotezy, analiza wyników wykazała, że ilość mikroorganizmów należących do mieszanych poziomów troficznych patotrofów (mianowicie patotrof-symbiotrof oraz patotrof-saprotof-symbiotrof) w próbkach gleby pochodzących z plantacji porażonych chorobowo jest statystycznie większa. W pozostałych próbkach pochodzących z ryzosfery, korzeni i części nadziemnych nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy próbkami pochodzącymi z plantacji porażonych oraz niewykazujących objawów chorobowych. Warto tutaj dodać, że Doktorantka ponownie swoje badania przeprowadziła na materiale badawczym obejmującym szeroki zakres próbek: pobranych z trzech odmian truskawki, zdrowych roślin oraz wykazujących symptomy chorobowe, założonych na różnych typach gleb, oraz w różnych lokalizacjach, a także z uwzględnieniem różnych systemów uprawy. Należy podkreślić, że pani mgr inż. Siegieda wykonała w tej części dysertacji bardzo dużą pracę, ponadto prawidłowo zauważyła wady niektórych metod analizy biostatystycznej i zaproponowała alternatywne rozwiązania. W ramach ostatniego manuskryptu, Autorka określiła mykobiom próbek jako składający się głównie z przedstawicieli typu Ascomycota i Basidiomycota, określiła także tzw. „mykobiom rdzeniowy”. Określiła go dla próbek niewykazujących objawów chorobowych oraz wykazujących objawy chorobowe, oraz wspólny dla jednych i drugich. Tutaj mam uwagę dotyczącą określenia „mykobiom rdzeniowy”, jest on bezpośrednim tłumaczeniem z języka angielskiego „core mycobiome”, jednak nie do końca jest to określenie właściwie oddające sens sformułowania. W przypadku „core mycobiome” lepiej znaczenie tego terminu oddawałby polski „mykobiom podstawowy”.

Bardzo ciekawym wnioskiem z badań jest ten dotyczący sieci grzybowych powiązań w mykobiomie roślin truskawki porażonych oraz pobranych z próbek plantacji roślin

niewykazujących symptomów chorobowych. Doktorantka zauważyła, że próbki pochodzące z porażonych chorobowo plantacji w obrębie zidentyfikowanych sieci charakteryzowały się bardziej rozproszonymi klastrami, natomiast w próbkach pochodzących ze zdrowych roślin obserwowano więcej połączeń między klastrami i wytrzymałość sieci, co wskazuje na ich większą stabilność.

W przypadku ostatniego manuskryptu nasuwają się następujące pytania, czy w analizach mykobiomu przeprowadzono sekwencjonowanie kontroli negatywnej? Analizy kilkuset publikacji przeprowadzone przez Hornung, B. V., Zwartink, R. D., & Kuijper, E. J. i opublikowane w 2019 w artykule pt.: „Issues and current standards of controls in microbiome research” *FEMS microbiology ecology*, 95(5), fiz045 wskazują, że tylko w ok. 30% publikacji, w których wykorzystano wysokoprzepustowe sekwencjonowanie zbiorowości dowolnego typu (na podst. 16S, 18S, ITS, analizy wiromu, analizy PacBio, Nanopore, itp.) opisano użycie jakiegokolwiek rodzaju kontroli negatywnej. Drugie pytanie dotyczy wykrycia obecności w próbkach z porażonych plantacji (lub zdrowych bezobjawowych) tych gatunków grzybów, dla których opracowała Doktorantka metody diagnostyczne: czy zostały one wykryte, a jeśli tak, to w jakich próbkach i jak często odnotowała Doktorantka ich obecność?

Wszystkie oryginalne publikacje oraz manuskrypt uzupełniający opatrzone są suplementami, zawierającymi uzupełnienie danych i wyników przeprowadzonych badań. Załączona dokumentacja jest starannie opracowana. Główną część dysertacji kończy obszerna, ale dobrze dobrana bibliografia oraz protokoły metod wykorzystanych w pracy. Na podstawie kolejnych prac stanowiących cykl, a zwłaszcza ostatniego manuskryptu widać rozwój Doktorantki, poszerzanie kompetencji nie tylko w zakresie wykorzystania metod badawczych, ale także w pracach koncepcyjnych, umiejętność rozwiązywania problemów badawczych oraz właściwego interpretowania danych.

**Wniosek końcowy.** Doktorantka przedstawiła cykl trzech recenzowanych publikacji naukowych oraz materiały uzupełniające w postaci manuskryptu, które poszerzają wiedzę dotyczącą zarówno mykobiomu upraw truskawek w uprawach ekologicznych, obecności grzybów patogenicznych oraz grzybopodobnych lęgniowców w próbkach środowiskowych, jak i dostarczają zoptymalizowanych protokołów diagnostycznych do wykrywania analizowanych patogenów. We wszystkich tych pracach Pani mgr inż. Dominika Siegieda jest autorem wiodącym, a oświadczenia wskazują na jej bardzo duży udział w powstaniu każdej z powyższych prac. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2020 r, poz. 85 z późn. zm.).

W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie o dopuszczenie pani mgr inż. Dominiki Siegiedy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Aleksandra Obrępańska-Stęplowska, prof. IOR-PIB

Poznań, 2022.11.15