

Lublin, 7 listopada 2022

Prof. dr hab. Monika Janczarek
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
tel. 81-537-59-09, monika.janczarek@mail.umcs.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Dominiki Siegiedy

Tytuł rozprawy: Opracowanie metod detekcji wybranych patogenów owoców miękkich z wykorzystaniem technik biologii molekularnej

(The development of detection methods for selected soft fruit pathogens using molecular biology techniques)

Rada Naukowa Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN w Lublinie wyznaczyła mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr inż. Dominiki Siegiedy dnia 12 września 2022 r. (Uchwałą Nr 210/P22/2022). Recenzję przygotowałam w oparciu o dane i informacje zawarte w otrzymanej rozprawie (wersja papierowa dzieła). Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Dominiki Siegiedy została przygotowana pod kierunkiem Pani promotor, prof. Magdaleny Frąc i promotora pomocniczego, dr. inż. Jacka Panka w Zakładzie Badań Systemu Gleba-Roślina Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN w Lublinie. Tematyka rozprawy doktorskiej mgr inż. D. Siegiedy jest ściśle związana z tytułem projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu BIOSTRATEG „Nowe rozwiązania biotechnologiczne w diagnostyce, zwalczaniu i monitoringu kluczowych patogenów grzybowych w ekologicznej uprawie owoców miękkich” (nr BIOSTRATEG3/344433/16/NCBR/2018), którego prof. Magdalena Frąc jest kierownikiem. Podjęta tematyka badawcza jest bardzo interesująca nie tylko ze względów poznawczych, ale przede wszystkim ważna i aktualna z powodu ogromnych strat powodowanych przez grzybowe fitopatogeny w rolnictwie ekologicznym. Polska należy do światowych liderów produkcji truskawek. Znaczną ich część stanowią uprawy ekologiczne, które prowadzone są w odpowiedzi na stale rosnący popyt na produkty ekologiczne w Europie. Stąd, podjęcie tematyki badawczej, mającej na celu polepszenie i zwiększenie efektywności upraw ekologicznych truskawek jest w pełni uzasadnione. W niniejszej rozprawie doktorskiej opracowano molekularne metody detekcji kluczowych patogenów truskawki, tj.

Botrytis cinerea, *Colletotrichum acutatum*, *Verticillium* spp. i grzybopodobnych lęgniowców z rodzaju *Phytophthora*, które przyczyniają się do znacznego obniżenia plonów tych owoców z upraw ekologicznych.

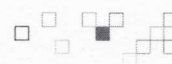
Mgr inż. Dominika Siegieda w trakcie prowadzenia swoich badań miała możliwość skorzystania z dużego doświadczenia naukowego i bogatego warsztatu metodycznego zespołu Pani Promotor, prof. Magdaleny Frąc, dzięki czemu otrzymała wiele interesujących wyników o dużych wartościach poznawczych i potencjale aplikacyjnym.

Ocena formalna rozprawy

Rozprawa doktorska została napisana w języku polskim i ma układ typowy dla tego rodzaju prac naukowych. Rozprawa zawiera wszystkie wymagane części: streszczenie (w języku polskim i angielskim), wykaz skrótów, spis publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, wprowadzenie, hipotezy badawcze oraz cel pracy, omówienie wyników, wnioski, publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, bibliografię, protokoły opracowanych metod, oświadczenia współautorów i życiorys naukowy Doktorantki. Podstawę rozprawy doktorskiej mgr inż. D. Siegieda stanowią cztery prace, z których jedna jest pracą przeglądową i trzy są pracami eksperymentalnymi. Spośród nich, trzy prace o sumarycznym współczynniku oddziaływania **IF 13,722** (zgodnie z rokiem opublikowania) (**IF_{5-letni} 16,318**, **Pkt_{MEIN} 380**) zostały opublikowane w latach 2019-2021 w czasopiśmie MDPI zawartych w bazie ISI Journal Citation Reports:

1. **Malarczyk (Siegieda) D.**, Panek J., Frąc M. Alternative molecular-based diagnostic methods of plant pathogenic fungi affecting berry crops – a review. **Molecules** **2019**, *24*, 1200. (**IF- 3,267**; **IF_{5-letni} 5,110**; **Pkt_{MEIN} 140**);
2. **Malarczyk (Siegieda) D.**, Panek J., Frąc M. Triplex real-time PCR approach for the detection of crucial fungal berry pathogens – *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp. and *Verticillium* spp. **Int. J. Mol.Sci.** **2020**, *21*, 8469. (**IF- 5,924**; **IF_{5-letni} 6,628**; **Pkt_{MEIN} 140**);
3. **Siegieda D.**, Panek J., Frąc M. „Shining a LAMP: (Loop-mediated isothermal amplification) on the molecular detection of phytopathogens *phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* in strawberry fields. **Pathogens** **2021**, *10*, 1453. (**IF- 4,531**; **IF_{5-letni} 4,580**; **Pkt_{MEIN} 100**);

W rozprawie zostały zawarte dodatkowo wyniki nieopublikowanych badań w formie przygotowanego manuskryptu pt. „Plant and soil health in organic plantations of strawberry – mycobiome biodiversity, fungal trophic modes and networks”, autorzy: **Siegieda D.**, Panek J., Frąc M., które dotyczą zastosowania metody wysokoprzepustowego sekwencjonowania Illumina SBS na platformie MiSeq w celu porównania mykobiomów „zdrowych”(tzn. niezakażonych) i zakażonych grzybowymi patogenami roślin truskawek. Mgr inż. D. Siegieda jest pierwszym autorem w czterech pracach. Z oświadczeń współautorów tych prac wynika, że rola Doktorantki w uzyskaniu wyników w nich zawartych oraz przygotowaniu publikacji była dominująca.

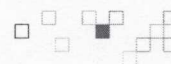


Ocena merytoryczna rozprawy

Praca stanowi bardzo obszerne opracowanie zawierające 266 stron. Rozprawa została przygotowana szczegółowo i starannie, zarówno pod względem merytorycznym, jak też graficznym i edytorskim. Rozdział Wprowadzenie (20 stron) zawiera opis zagadnień i metod badawczych wykorzystanych do przygotowania tej rozprawy. Treść tego rozdziału została wzbogacona 11 rysunkami i jedną tabelą. Hipotezy i cel pracy zostały sformułowane przez Doktorantkę jasno i szczegółowo. W rozdziale Omówienie wyników mgr inż. D. Siegieda opisała zwięźle podejścia metodyczne, zaproponowane rozwinięcia techniczne zastosowanych metod oraz ich użyteczność i skuteczność w uzyskaniu planowanych celów badawczych. Na podkreślenie zasługuje bogaty warsztat metodyczny Doktorantki, który obejmuje szereg technik z zakresu mikrobiologii, biologii molekularnej oraz bioinformatyki.

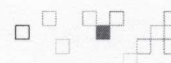
Celem rozprawy było opracowanie molekularnych technik bazujących na różnych wariantach reakcji amplifikacji DNA skutecznych w detekcji czterech kluczowych grzybowych fitopatogenów, które powodują największe straty w ekologicznych uprawach truskawek. Cele szczegółowe obejmowały: (1) opracowanie metody jednoczesnej detekcji trzech patogenów grzybowych (tj. grzybów z rodzajów: *Botrytis*, *Colletotrichum* i *Verticillium*) przy użyciu techniki multi-plex real-time PCR, (2) opracowanie metody detekcji grzybopodobnych lęgniowców (tj. *Phytophthora* spp. i *Phytophthora cactorum*) przy użyciu techniki LAMP (izotermicznej amplifikacji wykorzystującej zapętlenie) oraz (3) charakterystykę zbiorowisk grzybów występujących na ekologicznych plantacjach truskawek z wykorzystaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania techniką Illumina SBS (ang. *Sequencing-by-Synthesis*). Wszystkie zaplanowane cele cząstkowe zostały w pełni zrealizowane. Obie metody detekcji zostały opracowane szczegółowo, a ich warunki stosowania zoptymalizowane i skuteczność potwierdzona na różnych próbkach środowiskowych. Dotychczasowe dane literaturowe wskazywały na brak wystarczająco skutecznych i szybkich metod diagnostycznych, wykorzystujących techniki biologii molekularnej, które byłyby wysoce specyficzne i w krótkim czasie dostarczały jednoznacznych wyników dotyczących rodzaju patogenu grzybowego infekującego plantację truskawek i przyczyniałyby się do lepszej prewencji i/lub szybszej eliminacji patogena z plantacji, tym samym ograniczając straty producenta.

Z tych powodów, mgr inż. D. Siegieda na wstępie swojej pracy dokonała wnikliwego przeglądu aktualnego stanu wiedzy na temat dotychczas dostępnych molekularnych technik detekcji patogenów grzybowych infekujących truskawki. W rezultacie tych działań powstała obszerna i bardzo wartościowa praca przeglądowa opublikowana w *Molecules* (24,1200) w 2019 r. (**publikacja 1**). W pracy tej scharakteryzowano szczegółowo najważniejsze patogeny truskawek (tj., *Verticillium* spp., *Phytophthora* spp., *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*) pod względem częstości występowania, własności fenotypowych, zakresu gospodarza oraz zagrożeń dla upraw. W dalszej części pracy zebrano dostępne protokoły detekcji tych patogenów w oparciu o różne techniki PCR (tj. multiplex PCR, PCR, nested-PCR, qPCR, multiplex qPCR) i wykorzystujące polimerazy DNA, jak też omówiono



zalety i ograniczenia diagnostyczne tych metod. Doktorantka zebrała szczegółowe informacje na temat starterów i ich sekwencji wykorzystywanych do identyfikacji różnych gatunków grzybowych fitopatogenów oraz markerów genetycznych wybranych do tych analiz. Na tej podstawie okazało się, że region ITS (ang. Internal Transcribed Spacer) genu rybosomalnego RNA to najczęściej wykorzystywany marker do detekcji tych patogenów. Innymi często stosowanymi markerami były geny kodujące konserwatywne białka, takie jak: czynnik elongacji EF, dehydrogenaza GPD (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), syntaza tryptofanowa (ST), podjednostka dehydrogenazy NADH (NAD1), β -tubulina, aktyna, endochitynaza, podjednostka oksydazy cytochromowej (COX1) oraz białko szoku Hsp90. W efekcie powstała bardzo ciekawa praca przeglądowa podsumowująca aktualny stan wiedzy w diagnostyce tej grupy fitopatogenów i stanowiąca bardzo dobry punkt wyjścia do realizacji aplikacyjnych celów zaplanowanych w ramach tej rozprawy doktorskiej.

Następnie mgr inż. Dominika Siegieda przystąpiła do badań, których efektem było powstanie aż trzech prac o dużych walorach aplikacyjnych i poznawczych. W pierwszej pracy doświadczalnej (**publikacja 2 - Int. J. Mol. Sci. 2020, 21,8469**) Doktorantka opublikowała wyniki dotyczące opracowanej metody jednoczesnej detekcji trzech najistotniejszych patogenów grzybowych (*Verticillium* spp., *Botrytis* spp. i *Colletotrichum* spp.), wykorzystującej technikę real-time PCR. Co prawda, technika ta jest dość powszechnie stosowana do identyfikacji i detekcji różnych mikroorganizmów, ale dotychczas nie było opracowanej szybkiej, a jednocześnie wysoce specyficznej i czułej techniki wykrywania tych kluczowych patogenów grzybowych. Doktorantka zaprojektowała dwa startery oraz trzy sondy fluorescencyjne bazujące na sekwencji regionu D2 dużej podjednostki rRNA, z których każda była specyficzna wyłącznie dla jednego rodzaju grzyba. Sondy te okazały się skuteczne w jednoczesnym wykrywaniu patogenów z trzech rodzajów: *Verticillium*, *Botrytis* i *Colletotrichum* w tej samej próbce biologicznej. Dokonano optymalizacji opracowanej metody triplex-PCR w odniesieniu do stężeń stosowanych składników i warunków reakcji oraz określono czułość metody niezależnie dla każdego patogena (tj. minimalną wykrywaną ilość DNA patogena w próbce). Doktorantka ustaliła, że najbardziej stabilne i powtarzalne wyniki wartości C_q były dla stężenia 0,15 μ M w przypadku sond oraz 0,3 μ M dla mieszaniny starterów. Określiła też czułość tej metody na 39 fg/ μ L dla dwóch rodzajów *Verticillium* i *Botrytis* oraz 156 fg/ μ L dla rodzaju *Colletotrichum*. Zoptymalizowanie tylu parametrów reakcji triplex real-time PCR oraz metod izolacji DNA z różnego rodzaju próbek środowiskowych wymagało od Doktorantki dużego nakładu pracy, dokładności i precyzji w prowadzeniu tych badań. W tym miejscu, chciałam zapytać Doktorantkę jaka może być przyczyna ~4-krotnie obniżonej czułości metody w przypadku sondy dla rodzaju *Colletotrichum* w stosunku do dwóch pozostałych sond? Czy może to być spowodowane rodzajem fluorochromu zastosowanego w tej sondzie i/lub tworzeniem struktur drugorzędowych pomiędzy składnikami mieszaniny reakcyjnej, tj. starterami, sondami i/lub powstającymi amplikonami?



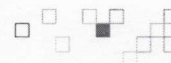
W dalszych etapach pracy, mgr inż. D. Siegieda potwierdziła skuteczność opracowanej metody triplex-PCR na materiale biologicznym w postaci próbek gleby oraz owoców truskawek sztucznie zainfekowanych zarodnikami 3 testowanych rodzajów grzybów. Dodatkowo, użyteczność tej metody przetestowała na ogromnej liczbie próbek środowiskowych pochodzących z plantacji truskawek w latach 2018-2019, które były zainfekowane grzybowymi patogenami (244; w tym, 41 z ryzosfery truskawek, 68 z gleby plantacji, 37 z owoców, 44 korzeni i 54 części zielonych truskawek). Plantacje te były prowadzone na różnych rodzajach gleb i uprawiano na nich rośliny różnych odmian. Co zasługuje na podkreślenie i docenienie, to ogromna ilość wykonanych przez Doktorantkę analiz (izolacji DNA i reakcji PCR) dla tak wielu próbek, co wymagało dużego nakładu czasu, jak też precyzji i skrupulatności. Dodatkową wartością prowadzonych badań było uzyskanie bardzo bogatej kolekcji szczepów grzybowych wyizolowanych z ekologicznych plantacji truskawek oraz zdeponowanie sekwencji ampikonów rDNA uzyskanych dla tych izolatów w bazie GenBank. Analizując wyniki tych badań, nasuwa się pytanie czy Doktorantka poczyniła pewne obserwacje dotyczące różnic w częstości pojawiania się patogenów *Verticillium* spp., *Botrytis* spp. i *Colletotrichum* spp. w poszczególnych plantacjach prowadzonych na różnych rodzajach gleb i dla poszczególnych odmian roślin? W rozprawie nie znalazłam bardziej szczegółowych informacji na temat właściwości fizykochemicznych gleb na poszczególnych plantacjach. Czy rodzaj gleby mógł predysponować do większej infekcyjności roślin przez te patogeny? Takie analizy porównawcze mogłyby dostarczyć dodatkowych interesujących wyników.

W kolejnych etapach badań, mgr inż. D. Siegieda przeprowadziła analizy molekularne, których celem było opracowanie skutecznej, szybkiej i relatywnie prostej metody detekcji *Phytophthora* spp., będących innymi istotnymi patogenami grzybowymi niszczącymi uprawy truskawek. (**publikacja 3 - Pathogens 2021, 10,1453**). Do wykrywania tych fitopatogenów, Doktorantka użyła innej techniki wykorzystującej polimerazę DNA, tzw. LAMP (amplifikację w warunkach izotermicznych), której zaletą jest prowadzenie reakcji w jednej stałej temperaturze. Jest to możliwe, gdyż stosowane do tego typu amplifikacji enzymy mają zdolność wypierania nici DNA, co eliminuje konieczność denaturacji matrycy. Technika LAMP jest ciekawą alternatywą wobec klasycznej reakcji PCR, ze względu na krótszy czas analizy oraz uzyskanie większych ilości produktu, którego detekcja nie wymaga posiadania termocyklera do real-time PCR. Dotychczas skuteczność i zalety tej techniki zostały potwierdzone w diagnostyce wielu różnych patogenów roślin, zwierząt i człowieka. Doktorantka z dużym powodzeniem opracowała metodę detekcji *Phytophthora* przy użyciu techniki LAMP i określiła optymalne jej parametry, wykorzystując do tego celu molekularny marker - gen kodujący jeden z czynników elongacji translacji (EF1- α). Opracowano łącznie 10 starterów, które były efektywne w detekcji i rozróżnianiu szczepów *Phytophthora* spp. (6 starterów) i *Phytophthora cactorum* (4 startery). Następnie Doktorantka potwierdziła skuteczność i wysoką czułość tej metody przy użyciu 19 izolatów należących do rodzaju *Phytophthora* (3 pg/ μ L dla *Phytophthora* spp. i 300 fg/ μ L dla *P. cactorum*). Do wizualizacji uzyskanego DNA w próbkach zastosowano klasyczny barwnik fluorescencyjny SYBR



Green I, co pozwala na szybką kolorymetryczną detekcję DNA w próbce badanej. Ogrom pracy został włożony przez Doktorantkę, która przeprowadziła badania na szeroką skalę dla 348 próbek środowiskowych zebranych z polskich plantacji truskawek (region Roztocza). Na podstawie tych analiz, mgr inż. D. Siegieda uzyskała pozytywne wyniki dla 1% wszystkich badanych próbek (4/348) w przypadku *Phytophthora* spp. oraz 4% (13/348) w przypadku *P. cactorum*, które pochodziły z plantacji nie wykazujących oznak infekcji tymi fitopatogenami. Dane te wskazują na skuteczność i dużą czułość metody LAMP w identyfikacji tych grzybów w materiale środowiskowym. Dodatkowo Doktorantka wykazała, że nie jest wymagane specjalne przygotowanie próbek DNA do wykonania tej analizy. Co warto podkreślić, wszystkie opracowane przez Doktorantkę i pozostałe osoby z zespołu prof. M. Frąc startery i sondy oraz protokoły dwóch metod detekcji grzybowych patogenów truskawek należących do czterech ww. rodzajów stały się podstawą uzyskania czterech patentów (P.431985, P.431986, P.431987, P.431988) i dwóch zgłoszeń patentowych (P.437110 i P.437111). Uważam, że te wyniki stanowią bardzo ważne osiągnięcie naukowe o ogromnym potencjale biotechnologicznym. Podsumowując, opracowana technika LAMP i jej łatwość przeprowadzenia może przyczynić się do szerokiego jej stosowania, również poza bogato wyposażonymi laboratoriami molekularnymi. W tym miejscu, nasuwa się pytanie czy Doktorantka nie próbowała opracować techniki LAMP także dla pozostałych patogenów truskawek (tj., *Verticillium* spp., *Botrytis* spp. i *Colletotrichum* spp.), co mogłoby umożliwić jednoczesne wykonanie takiej analizy dla wszystkich czterech kluczowych grzybowych patogenów tych roślin? Co zadecydowało o wyborze przez Doktorantkę *Phytophthora* spp. i *P. cactorum* jako celu detekcji przy użyciu techniki LAMP?

W ostatnim etapie pracy, Doktorantka skupiła się na badaniach, których celem była charakterystyka mykobiomów roślin truskawek niezainfekowanych i zainfekowanych patogenami grzybowymi. Ta część wyników nie została jeszcze opublikowana, ale zostały one opracowane i pokazane w formie manuskryptu przygotowanego do publikacji (**praca 4**). Mgr inż. D. Siegieda scharakteryzowała zbiorowiska grzybów występujących na ekologicznych plantacjach truskawek, uwzględniając zróżnicowanie mykobiomów poszczególnych nisz ekologicznych, tj. gleby, ryzosfery, jak też części nadziemnych i korzeni roślin. Porównane zostały mykobiomy plantacji niezakażonych i plantacji z objawami chorobowymi. Do tych badań Doktorantka wykorzystwała technikę wysokoprzepustowego sekwencjonowania Illumina SBS i aparatu MiSeq, która umożliwia scharakteryzowanie pełnych mikrobiomów czy mykobiomów, dzięki temu że pozwala na odczytanie krótkich fragmentów sekwencji DNA, zapewniając tym samym, odczyt setek tysięcy różnych sekwencji obecnych w próbce. W mojej ocenie, wyniki uzyskane z tej części badań są bardzo interesujące i mają ogromny walor poznawczy, choć w przyszłości mogą również przyczynić się do opracowania skutecznych szczepionek promujących wzrost i polepszenie kondycji uprawianych roślin użytkowych. Doktorantka wykazała, że mykobiom badanych próbek składał się głównie z przedstawicieli typu Ascomycota (34,6%-93,53%, średnia – 69,22%) i Basidiomycota (3,53%-63,27%, średnia – 22,43%), co było zgodne z wynikami wcześniej opisanymi przez innych badaczy. Ponadto, sprawdzono czy

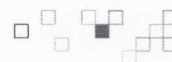


status zdrowotny truskawek ma wpływ na różnorodność mikrobiologiczną. Przeprowadzone przez Doktorantkę analizy statystyczne wykazały, że status zdrowotny tych roślin nie miał wpływu na α -różnorodność zbiorowisk grzybów, gdy ten parametr był analizowany jednocześnie dla wszystkich próbek, jak też dla próbek z ryzosfery i części nadziemnych roślin. Natomiast α -różnorodność była istotnie obniżona w przypadku zainfekowanych korzeni truskawek. Co zaskakujące i będące w opozycji do badań prowadzonych nad mykobiomem pomidora, α -różnorodność była istotnie wyższa w próbkach gleby zainfekowanej fitopatogenami. W tym miejscu, chciałabym zapytać Doktorantkę jak wyjaśniłaby uzyskany wynik?

Następnie wykonano analizy β -różnorodności (wykresy PCoA, analiza PERMANOVA), na podstawie których oszacowano skład zbiorowości i potwierdzono statystyczną różnicę pomiędzy typami próbek i stanem ich kondycji zdrowotnej. Gdy analizowano indywidualnie poszczególne typy próbek (tj. ryzosferowe, glebowe, części nadziemnych i korzeni roślin), wykazano, że skład zbiorowiska grzybów różnił się pomiędzy próbkami zawierającymi niezakażony i zakażony materiał biologiczny. Ale jednorodne dyspersje grupowe pomiędzy stanem zdrowotnym próbek wykazano tylko w próbkach zawierających części nadziemne i korzenie roślin. Kolejnym badanym parametrem była różnica w obfitości grzybowych mikroorganizmów zaklasyfikowanych do 6 grup troficznych. W przypadku próbek ryzosfery, liści i korzeni roślin nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy próbkami bez oznak infekcji (tzw. „zdrowymi”) i zainfekowanymi patogenem.

Doktorantka scharakteryzowała także mykobiom rdzeniowy i zidentyfikowała występujące w nim gatunki grzybów (tj. gatunki obecne w co najmniej 95% próbek i stanowiące 0,1% względnej liczebności w próbce) dla próbek zainfekowanych i niezainfekowanych, pochodzących z gleby, ryzosfery oraz łodyg i korzeni roślin. Wykonała także analizę różnicową gatunków występujących na plantacjach bez oznak porażenia oraz porażonych infekcją i dokonała ciekawych obserwacji, z których część może być w przyszłości wykorzystana do tworzenia szczepionek (dotyczy to m.in. taksonu *Acremonium* sp. i grzybów z rodzaju *Mortierella* znanych z posiadania własności hamowania rozwoju chorób i promowania wzrostu roślin). Efektem finalnym tej części badań było zidentyfikowanie (do rodzaju) 20 najliczniej występujących ASV (ang. Amplicon Sequence Variant) we wszystkich próbkach łącznie oraz indywidualnie w każdym typie próbek. Wyniki te uważam za bardzo interesujące i cenne, nie tylko ze względów poznawczych, ale także ich potencjalnych korzyściach aplikacyjnych. Doktorantka wykorzystała do analiz parametrów mykobiomów plantacji niezainfekowanych i zainfekowanych grzybowymi patogenami ilość próbek różniących się istotnie liczbowo (strona 50 rozprawy, np. n116 „healthy” i n35 „unhealthy”, n29 „healthy” i n9 „unhealthy” itd.). W związku z tym mam pytanie, czy ta dysproporcja w ilości próbek między dwoma warunkami środowiskowymi mogła mieć wpływ na badane parametry mykobiomów?

Podsumowując, chciałabym pokreślić szeroki zakres prac przeprowadzonych przez mgr inż. Dominikę Siegiedę, wielowątkowość, złożoność i czasochłonność wielu eksperymentów i licznych analiz z użyciem wielu próbek środowiskowych. Dzięki dużemu zaangażowaniu, dokładności i



pracowitości Doktorantka zgromadziła bardzo dużą ilość wartościowych wyników oraz poczyniła wiele ciekawych obserwacji.

Do **najważniejszych osiągnięć tej rozprawy zaliczam:**

- 1) opracowanie szybkiej, wysoce specyficznej i czułej metody jednoczesnej detekcji kluczowych patogenów grzybowych truskawek należących do rodzajów *Verticillium*, *Botrytis* i *Colletotrichum* z wykorzystaniem techniki triplex-PCR w czasie rzeczywistym, starterów i sond fluorescencyjnych;
- 2) opracowanie metody detekcji patogenów grzybowych truskawek należących do *Phytophthora spp.* i *P. cactorum* z wykorzystaniem techniki LAMP, której łatwość wykonania umożliwia zastosowanie na matrycy DNA wyizolowanym bezpośrednio ze środowiska;
- 3) uzyskanie 4 patentów i 2 zgłoszeń patentowych dotyczących zaprojektowanych starterów, sond oraz optymalizacji warunków reakcji dwóch opracowanych metod detekcji grzybowych patogenów infekujących rośliny truskawek;
- 4) scharakteryzowanie i porównanie mykobiomów środowisk zainfekowanych grzybowymi patogenami truskawek i środowisk niezainfekowanych tymi mikroorganizmami;
- 5) wykazanie różnic między mykobiomem gleby i roślin na plantacjach porażonych i niezainfekowanych patogenami (w tym różnice w α -różnorodności gleby i korzeniach oraz różnice w stabilności sieci powiązań).

Doceniając dużą staranność i szczegółowość, z jaką Doktorantka przygotowała tę rozprawę doktorską, mimo tego nie udało się uniknąć nielicznych niefortunnnych sformułowań, które z powinności recenzenta powinien wymienić, takich jak: „porażone próbki”, „zdrowe próbki”, „chore próbki ryzosfery”, „plantacje zdrowe i chore”. W mojej ocenie bardziej adekwatne byłoby użycie określenia np. próbki zawierające materiał roślinny zakażony lub niezakażony patogenami grzybowymi, czy próbki gleby zawierające lub zainfekowane patogenami grzybowymi itp. Ta drobna uwaga nie umniejsza w żadnym stopniu mojej bardzo wysokiej oceny rozprawy doktorskiej mgr inż. Dominki Siegiedy.

Ponadto, chciałam podkreślić dodatkową wyróżniającą się aktywność naukową Doktorantki i Jej udział w licznych konferencjach krajowych (6 wystąpień ustnych i 7 posterów) i międzynarodowych (5 wystąpień i 2 postery), szkoleniach, kursach oraz międzynarodowym grantie H2020. Za swoją aktywność była kilkakrotnie nagrodzona na konferencjach naukowych (dwukrotnie w 2021) oraz przez Dyrektora Instytutu Agrofizyki PAN (2018, 2021). Co godne docenienia, mgr inż. D. Siegieda pomimo swojej dużej aktywności naukowej potrafiła jeszcze znaleźć czas na prowadzenie dodatkowej działalności organizacyjnej, biorąc udział w pracach licznych komisji związanych z działaniem Studiów Doktoranckich w Instytucie Agrofizyki PAN.




Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr. inż. Dominiki Siegiedy stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej, dotyczącego charakterystyki mykobiomów truskawek oraz molekularnych metod detekcji i identyfikacji patogenów grzybowych infekujących tę ważną roślinę uprawną. Rozprawa ta potwierdza ogólną wiedzę i umiejętność prowadzenia badań przez Doktorantkę na wysokim poziomie naukowym. Wyniki uzyskane w ramach tej rozprawy doktorskiej przyczyniły się do istotnego pogłębienia wiedzy na temat składu i bioróżnorodności mykobiomów gleb oraz roślin w nich uprawianych w warunkach ekologicznych, jak też efektywnej i szybkiej ich detekcji. W mojej ocenie, rozprawa ta spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim, określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 ze zm.). W związku z powyższym, zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN w Lublinie z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Dominikę Siegiedę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Jednocześnie, biorąc pod uwagę szeroki zakres prowadzonych badań, wartość naukową i aplikacyjną uzyskanych wyników, uzyskanie czterech patentów oraz dwóch zgłoszeń patentowych dotyczących oryginalnych własnych opracowań metodyki diagnostycznej, jak też opublikowanie większości uzyskanych wyników w trzech pracach, w których mgr inż. Dominka Siegieda jest pierwszym autorem, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN w Lublinie o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą. W uzasadnieniu stwierdzam, że wyniki uzyskane przez mgr inż. Dominikę Siegiedę mają dużą wartość naukową i aplikacyjną, co może w przyszłości przyczynić się do lepszego zrozumienia funkcjonowania tej grupy grzybów fitopatogenicznych i ich monitorowania w środowisku glebowym.



Prof. dr hab. Monika Janczarek

