



UNIwersytet Jagielloński  
w Krakowie

Kraków, 16 Listopada 2022 r.

**Dr hab. Piotr Rozpądek**  
**Małopolskie Centrum Biotechnologii,**  
**Uniwersytet Jagielloński w Krakowie**  
**ul. Gronostajowa 7a, 30-087 Kraków**



**MAŁOPOLSKIE  
CENTRUM  
BIOTECHNOLOGII**

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Siegiedy zatytułowanej:  
„Opracowanie metod detekcji wybranych patogenów owoców miękkich  
z wykorzystaniem biologii molekularnej” wykonanej w Instytucie  
Agrofizyki PAN w Lublinie pod kierownictwem prof. dr hab. Magdaleny  
Frąc i dra inż. Jacka Panka**

Recenzowana praca doktorska składa się z dwóch opublikowanych prac oryginalnych, jednej opublikowanej pracy przeglądowej oraz nieopublikowanego manuskryptu (badania uzupełniające). Wszystkie trzy artykuły zostały opublikowane w czasopiśmie wydawnictwa MDPI, prace oryginalne w *International Journal of Molecular Science* oraz *Pathogens*, artykuł przeglądowy w *Molecules*. Wszystkie artykuły oraz nieopublikowany manuskrypt stanowią spójną tematycznie całość. Praca doktorska opatrzona jest wstępem wprowadzającym czytelnika w zagadnienia poruszone w artykułach, streszczeniem artykułów w języku polskim, szczegółowym opisem metod badawczych oraz wnioskami. Ostatnie rozdziały pracy obejmują bibliografię, protokoły badawcze, oświadczenia współautorów oraz życiorys naukowy Doktorantki.

Tematyka pracy doktorskiej jest niezwykle interesująca i co najważniejsze, wychodzi naprzeciw zapotrzebowaniu społeczeństwa, a także i zmieniającemu się rolnictwu w Polsce i w Europie.

Rolnictwo ekologiczne jest najbardziej zrównoważoną formą produkcji rolnej na świecie. Według planów Komisji Europejskiej (strategia od Pola do

ul. Gronostajowa 7a  
30-348 Kraków  
tel. +48 12 664 53 69  
[www.mcb.uj.edu.pl](http://www.mcb.uj.edu.pl)



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Stołu oraz Na Rzecz Bioróżnorodności) do 2030 r. aż 25% produkcji rolnej w Europie powinno pochodzić z rolnictwa ekologicznego. Rolnictwo ekologiczne, oprócz pozytywnego oddziaływania na środowisko (korzyści rolno-środowiskowe), wychodzi naprzeciw zmieniającej się strukturze popytu i zwiększającym się wymaganiom konsumentów.

Popyt na żywność ekologiczną w UE przewyższa podaż, co, wraz ze specyfiką produkcji, powoduje konieczność importu niektórych produktów spoza UE. Według rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2018/848, system importu produktów ekologicznych z państw trzecich oparty o zasadę równowagi będzie wygaszany. Należy założyć więc, że spowoduje to dodatkowe zwiększenie popytu na surowce pochodzące z upraw ekologicznych na rynku wewnętrznym Unii oraz zwiększoną wymianę handlową pomiędzy państwami UE.

Produkcja rolna w Polsce stanowi ważny element gospodarki narodowej. Według danych Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi w okresie od stycznia do września 2020 r. wartość eksportu artykułów rolno-spożywczych z Polski wyniosła 25 070 mln EUR. Oznacza to wzrost o 6,7% w stosunku do analogicznego okresu w 2019 roku.

Produkcja rolna, zarówno w Polsce jak i w Europie, wymaga unowocześnienia, dzięki któremu dostosowana zostanie jakość produktu do zwiększonych wymagań konsumentów oraz zaostrzonych regulacji środowiskowych. Implementacja zasad zintegrowanej ochrony roślin - ochrony roślin, w której pierwszeństwo mają metody niechemiczne, spowodowała konieczność poszukiwania agrotechnicznych, fizycznych i biologicznych metod ochrony roślin. Obecnie na rynku europejskim obserwuje się wycofywanie kolejnych substancji czynnych, co wiąże się z ograniczeniem możliwości stosowania tradycyjnych (chemicznych) metod ochrony upraw. Jednym z ważnych kierunków modernizacji rolnictwa jest zastosowanie biopreparatów na bazie mikroorganizmów (bakterii i grzybów) posiadających zdolność biotyżacji roślin, tj. zwiększenia przystosowania roślin do bytowania w środowisku (agroceniezie) oraz biokontroli propagacji drobnoustrojów chorobotwórczych roślin.



MAŁOPOLSKIE  
CENTRUM  
BIOTECHNOLOGII

ul. Gronostajowa 7a  
30-348 Kraków  
tel. +48 12 664 53 69  
[www.mcb.uj.edu.pl](http://www.mcb.uj.edu.pl)



UNIwersytet Jagielloński  
w Krakowie

Odpowiednia diagnostyka upraw ma niezwykle znaczenie w kontroli propagacji patogenów. Pozwala na optymalizację strategii ochrony roślin z uwzględnieniem ograniczeń w stosowaniu chemicznych środków ochrony roślin wynikających ze zmieniającego się ustawodawstwa.

Podczas swoich studiów doktorskich mgr Dominika Siegieda opracowała metody detekcji drobnoustrojów chorobotwórczych: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Verticillium* spp. oraz *Phytophthora* sp. w owocach truskawki pochodzącej z upraw ekologicznych w południowo-wschodniej Polsce. W swojej pracy doktorskiej Autorka przedstawiła szczegółowe uzasadnienie celowości podjętych działań, jak również szczegóły techniczne opracowanych technologii.



MAŁOPOLSKIE  
CENTRUM  
BIOTECHNOLOGII

Pierwszym artykułem w cyklu jest praca przeglądowa, w której Autorka charakteryzuje patogeny będące przedmiotem kolejnych publikacji. Artykuł zatytułowany: “Alternative Molecular-Based Diagnostic Methods of Plant Pathogenic Fungi Affecting Berry Crops—A Review” został opublikowany w czasopiśmie *Molecules*. W pracy zostały opisane i porównane dostępne metody detekcji wybranych pasożytów, jak również elementy biologii tych mikroorganizmów. Zarówno publikacja, jak i analogiczne treści przedstawione we wprowadzeniu, są dobrym wstępem do pozostałych artykułów z cyklu. Na uwagę zasługuje wysoka jakość i przejrzystość ilustracji we wprowadzeniu.

W artykule: “Triplex Real -Time PCR Approach for the Detection of Crucial Fungal Berry Pathogens – *Botrytis* ssp., *Colletotrichum* ssp. and *Verticillium* ssp.” opublikowanym w *International Journal of Molecular Science* Autorzy przedstawili metodę symultanicznej detekcji trzech grzybowych pasożytów owoców miękkich. W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę na fakt wykorzystania technik biologii molekularnej w rolnictwie. W praktyce rolniczej w Polsce, wykorzystanie tych technik jest niewystarczające. Działania podjęte przez Autorów pracy w ramach projektu Biostrateg *EcoFruits* pod kierownictwem prof. dr hab. Magdaleny Frąc mogą przyczynić się do popularyzacji tych metod. Z dużym prawdopodobieństwem, zwiększy to potencjał i konkurencyjność polskiego rolnictwa. Opracowana metoda została

ul. Gronostajowa 7a  
30-348 Kraków  
tel. +48 12 664 53 69  
[www.mcb.uj.edu.pl](http://www.mcb.uj.edu.pl)



pozytywnie zweryfikowana na roślinach i w glebie. Poniżej, moje uwagi do tej części pracy:

1. Specyficzność reakcji. Pomimo stwierdzenia, że w reakcji amplifikowano wyłącznie DNA określonego patogenu nie znalazłem wyników badań, które by to potwierdzały. W moim przekonaniu, aby jednoznacznie wykazać specyficzność zaprojektowanej reakcji należało wykonać analizę krzywej topnienia produktów reakcji PCR (*ang. melting curve*). Alternatywą jest sekwencjonowanie produktów reakcji. Dotyczy to reakcji amplifikacji pojedynczych markerów, a nie reakcji multiplex.
2. Str. 91 rysunek 2d. Krzywe przyrostu fluorescencji (*ang. amplification curves*) dla niektórych sond wskazują na bardzo słabą amplifikację/fluorescencje, na rycinach (wszystkich) nie uwzględniono progu detekcji (*ang. Ct threshold value*).
3. W procesie optymalizacji reakcji sprawdzano zależność pomiędzy stężeniem sond oraz starterów a wartością C<sub>q</sub> i na tej podstawie dobrano optymalne ich stężenia. Przedstawione w tabeli wyniki świadczą raczej o braku zależności. Nie rozumiem zatem na jakiej podstawie ustalono skład mieszaniny reakcyjnej.
4. Określenie limitu detekcji reakcji. Dla przejrzystości procedury, zawsze warto w takich badaniach uwzględnić kontrolę negatywną (*ang. NTC – no template control*).
5. Nie zbadano wydajności reakcji amplifikacji. Jest to niezbędne przy analizach ilościowych. Z treści publikacji wnioskuję, że celem Autorów było opracowanie metody detekcji, a nie kwantyfikacji zawartości DNA grzybowego w roślinach i glebie. Nie zmienia to faktu, że określenie wydajności reakcji pozwala oszacować błąd amplifikacji i zweryfikować stechiometrię reakcji. Z danych przedstawionych w artykule (tabela 3 str. 96) wnoszę, że w zakresie stężeń użytych w doświadczeniu reakcja nie zachodzi z wydajnością bliską 100%. Można to wytłumaczyć niskimi stężeniami DNA użytymi w reakcji. Przedstawienie wydajności reakcji dla poszczególnych par sond (standardowa procedura przy optymalizacji reakcji PCR) zwiększyłaby przejrzystość przedstawionych wyników.



6. Na czym polega nowatorstwo przedstawionej techniki? Czym różni się od innych, podobnych dostępnych na rynku? Myślę, że taka dyskusja zwiększyłaby wartość przedstawionych wyników.

W kolejnej publikacji z cyklu: „Shinning a Lamp” (Loop-mediated Isothermal Amplification) on The molecular detection of Phytopathogens *Phytophthora* ssp and *Phytophthora cactorum* in Strawberry Fields”, opublikowanej w *Pathogens* Autorzy opracowali metodę detekcji lęgniowców z rodzaju *Phytophthora* w oparciu o metodę LAMP. Detekcja fitopatogenów w oparciu o tę technikę ma szereg przewag nad detekcją przy pomocy PCR (ma również wady). Zalety te zostały opisane i wnikliwie przedyskutowane w pracy doktorskiej. W moim przekonaniu łatwość zastosowania tej metody czyni ją szczególnie ważną z punktu widzenia możliwości zastosowania w rolnictwie.

Ostatnim z cyklu prac wchodzących w skład dysertacji doktorskiej mgr Dominiki Siegiedy jest manuskrypt artykułu: “Plant and soil health in organic plantations of strawberry – mycobiome biodiversity, fungal trophic modes and networks”. W manuskrypcie opisano strukturę społeczności grzybów epi- i endofitycznych truskawek oraz gleb upraw ekologicznych w południowej Polsce. Manuskrypt jest przygotowany poprawnie, cel badań dobrze uzasadniony. Na uwagę zasługuje fakt skupienia się w pracy na analizie mykobiomu. Nasza wiedza na temat struktury społeczności grzybów zasiedlających dane środowisko jest bardzo niewielka; większość prowadzonych badań ogranicza się do analizy składu bakterii zasiedlających roślinę/glebę. W związku z czym, przedstawione wyniki stanowią istotny wkład w rozumieniu zależności pomiędzy organizmami w środowisku.

Moje uwagi:

1. Czy na etapie przygotowania bibliotek z próbek roślin podjęto próbę eliminacji/ograniczenia amplifikacji roślinnego DNA? Czy taki zabieg jest celowy? Jeżeli nie, to jaki procent uzyskanych sekwencji był pochodzenia roślinnego?
2. Czy podczas przygotowania bibliotek z próbek glebowych podjęto próbę eliminacji relikowego DNA? Co Autorka myśli o takim zabiegu?



3. Brakuje uzasadnienia doboru kryteriów kwalifikacji ASV do mykobiomu rdzeniowego. Zastosowane kryteria są mało rygorystyczne. Dotyczy to szczególnie kryterium względnej obfitości danego ASV w populacji (0.1%)
4. Rysunek 7a str 50 (jak również ten sam rysunek na str. 206). Z treści artykułu nie jest dla mnie jasne co oznacza n. Schematyczne przedstawienie układu eksperymentalnego ułatwi percepcję manuskryptu.
5. Na stronie 50 Autorka pisze: „...Następnie wykonano wykresy PCoA dla każdego typu próbki indywidualnie, według stanu zdrowia. Analiza PERMANOVA wykazała, że we wszystkich grupach próbek - w glebie ryzosferowej, częściach nadziemnych, korzeniach i glebie pozaryzosferowej, skład zbiorowiska grzybów różnił się pomiędzy zdrowymi i porażonymi próbkami i wyjaśniał odpowiednio 4,7%, 4,9%, 3,6% i 5,2% zmienności próbki. Jednak tylko próbki pędów i korzeni wykazywały jednorodną dyspersję grupową pomiędzy stanem zdrowotnym (Rysunek 7D)...” 5% zmienności to jest bardzo mało. Jestem zaskoczony tak małą zmiennością, jak również stosunkowo niewielką liczbą grzybów wchodzących w skład mikrobiomów rdzeniowych. Rozumiem, że w kolejnych analizach opisano różnicę pomiędzy zbiorowiskami. Dodatkowo, wykonano analizę PCoA, którą zilustrowano na wykresach – styl.
6. Jakie są ograniczenia metody użytej do analizy struktury społeczności mikroorganizmów w środowisku? Proszę o przedyskutowanie podczas obrony.

Podsumowując: dysertacja doktorska mgr Dominiki Siegiedy jest dobrze przygotowana i spójna tematycznie. Nieliczne kolokwializmy, skrótowe myślowe i uproszczenia nie rzutują na wartość i jakość przedstawionych wyników.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2018 poz. 1668 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki *im. Bohdana Dobrzańskiego* PAN o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.