

Poznań 1.05.2016

Prof. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak  
Zakład Wirusologii Molekularnej  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza  
w Poznaniu

## O C E N A

rozprawy doktorskiej

*Determinanty patogeniczności wirusa nekrozy pomidora (Tomato torrado virus, ToTV)*  
wykonanej przez mgra PRZEMYSŁAWA WIECZORKA

pod kierunkiem dr hab. Aleksandry Obrępańskiej-Stęplowskiej w Międzyzakładowej Pracowni Biologii Molekularnej, Zakładu Wirusologii i Bakteriologii Instytutu Ochrony Roślin Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgra Przemysława Wieczorka składa się z pięciu oryginalnych jednotematycznych prac:

1. Wieczorek Przemysław, Budziszewska Marta, Obrępańska-Stęplowska Aleksandra, *Construction of infectious clone soft tomato torrado virus and their delivery by agrofiltration*, Archives of Virology, 2015, 160, 517-521 (IF 2.390, MNiSW 20 pkt)
2. Wieczorek Przemysław, Obrępańska-Stęplowska Aleksandra, *A single amino acid substitution in movement protein of tomato torrado virus influences ToTV infectivity in Solanum lycopersicum*, Virus Research, 2016, 213, 32-36 (IF 2.324, MNiSW 25 pkt)
3. Wieczorek Przemysław, Obrępańska-Stęplowska Aleksandra, *The N-terminal fragment of tomato torrado virus, NA 1-encoded polyprotein induces hypersensitive response (HR)-like reaction in Nicotiana benthamiana*, Archives of Virology, 2016. DOI: 1007/s00705-016-2841-8
4. Wieczorek Przemysław, Wrzesińska Barbara, Obrępańska-Stęplowska Aleksandra, *Assessment of reference gene stability influenced by extremely divergent disease symptoms in Solanum lycopersicum L.*, Journal of Virological Methods, 2013, 194, 161-168
5. Wieczorek Przemysław, Obrępańska Stęplowska Aleksandra, *Multiplex RT-PCR reaction for simultaneous detection of Tomato Torrado virus and Pepino mosaic virus co- infecting Solanum lycopersicum*, Journal of Plant Protection Research/Postępy w Ochronie Roślin, 2013, 52, 289-294

Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach o szerokim zasięgu międzynarodowym, a ich sumaryczny współczynnik wpływu IF wynosi 8.987, co odpowiada 95 pkt. MNiSW. We wszystkich pracach Przemysław Wieczorek jest pierwszym autorem i jak wynika z załączonych oświadczeń współautorów, Doktorant pełnił w badaniach rolę wiodącą.

Do prac dołączony jest krótki, 16-stronicowy maszynopis, w którym autor w sposób zwięzły i jasny przedstawia budowę wirusa nekrozy pomidora ToTV, jego patogeniczność, hipotezy badawcze dotyczące czynników determinujących patogeniczność wirusa, cele pracy, opis metod stosowanych w pracy, uzyskane wyniki oraz wnioski. Na uwagę zasługuje staranny i bardzo przejrzysty sposób przedstawienia załączonej do oceny dokumentacji.

Głównym celem badań mgra Przemysława Wieczorka było poszukiwanie kodowanych przez wirusa nekrozy pomidora (*Tomato torrado virus* ToTV) determinantów indukujących objawy chorobowe na pomidorze i tytoniu oraz określenie ich udziału w procesie potranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genów (PTGS), ponadto opracowanie protokołu diagnostycznego do detekcji dwóch wirusów ToTV i PepMV, infekujących pomidora i wywołujących zbliżone objawy chorobowe.

Poza tym, Doktorant postanowił zbadać ekspresję genów referencyjnych w roślinie *Solanum lycopersicum* po zakażeniu ToTV, w celu wybrania genów o najbardziej stabilnej ekspresji. Mgr Przemysław Wieczorek badania nad czynnikami determinującymi patogeniczność wirusa ToTV rozpoczął od otrzymania infekcyjnych klonów tego wirusa. Kopie cDNA nici RNA1 i RNA2 wirusa otrzymał na matrycy RNA, izolowanych z roślin porażonych wirusem ToTV-Kra. Obydwie kopie cDNA wprowadził następnie do odpowiednich wektorów, którymi transformował *Agrobacterium tumefaciens*. Zawiesinę transformantów Doktorant infiltrował do blaszki liścia siewek *S.lycopersicum* i *N.benthamina*. Uzyskane klony infekcyjne ToTV powodowały objawy chorobowe na obu roślinach – pomidorze i tytoniu – takie same, jakie obserwowano wcześniej na roślinach porażonych ToTV.

Do pozyskania agroinfekcyjnych klonów wirusa Doktorant zastosował metodę rekombinacyjnego izotermicznego klonowania. Szczegółowy opis ich otrzymania jest przedstawiony w publikacji 1. (Archives of Virology 2015, 160, 517-521). Mgr Przemysław Wieczorek metodę tę po raz pierwszy opisał w literaturze przedmiotu.

Następnie, stosując tę technikę Doktorant otrzymał dziesięć wariantów klonów, którymi infiltrował *Solanum lycopersicum* cv. Beta Lux i *Nicotiana benthamina*. Wyniki tych badań wykazały, że zmiana pojedynczego nukleotydu T > C w pozycji 1329 w rejonie domeny kodującej białko 3A wirusa, prowadząca do podstawienia fenyloalaniny leucyną w pozycji 210 w białku, skutkowałą utratą zdolności wirusa do infekowania *S.lycopersicum*, natomiast mutant ten infekował i indukował objawy chorobowe w tytoniu. Wpływ mutacji na infekcyjność wirusa, patogeniczność oraz zdolność adaptacji do nowych gospodarzy mgr Przemysław Wieczorek przedstawił w pracy 2. (Virus Research 2016, 213, 32-36). Poszukując determinantów patogeniczności wirusa ToTV, Doktorant postanowił sprawdzić rolę domeny 11K, zlokalizowanej w ORF RNA1.

Dane literaturowe, jak również wyniki badań własnych sugerowały, że domena ta koduje białko o masie cząsteczkowej 11.33kDa, które indukuje reakcję nekrotyczną w *N.benthamina* podobną do HR. Przemysław Wieczorek sekwencję tę wprowadził do potywirusa X i tak zrekombinowanym wirusem zakażał *N.benthamina*. Zmiana taka doprowadziła do znacznego wzrostu patogeniczności wirusa, chociaż nie towarzyszył temu wzrost akumulacji genomowego i subgenomowego RNA wirusa chimerycznego. Zdaniem Doktoranta, białko to jest przypuszczalnie zaangażowane w dezorganizację błon komórkowych, co powoduje nekrozę, natomiast nie bierze udziału w PTGS w roślinie. Problem ten jest dokładnie opisany i dyskusowany w 3. pracy włączonej przez mgra Wieczorka do cyklu prac składających się na Jego rozprawę doktorską (Archives of Virology 2016 DOI: 1007/s00705-016-2841-8).

Wyniki badań załączone w przytoczonych powyżej pracach znacznie rozszerzają naszą wiedzę na temat wpływu zakażeń wirusem ToTV wybranych roślin oraz wskazują domeny determinujące zdolność wirusa do zakażenia i porażania różnych gospodarzy. Uważam to za najważniejsze osiągnięcie Doktoranta. Główny cel badań Doktorant w pełni zrealizował.



Ponadto, mgr Przemysław Wieczorek opracował testy diagnostyczne umożliwiające wykrywanie oraz rozróżnianie zakażeń roślin dwoma gatunkami wirusów ToTV i PepMV. Metoda ta, opierająca się na reakcji multiplex RT-PCR oraz analizie krzywych topnienia produktów amplifikacji, jest szczegółowo opisana w 4. pracy załączonego cyklu (Journal of Plant Protection Research 2013, 53). Zaproponowany przez Doktoranta test pozwala na wykrywanie obu wirusów w pojedynczej próbie. Metoda ta znajduje na pewno zastosowanie w identyfikacji i ochronie roślin przed zakażeniami wirusami ToTV i PepMV.

Wśród prac składających się na rozprawę doktorską mgr Przemysław Wieczorek załączył także publikację prezentującą wyniki badań Doktoranta nad analizą poziomu ekspresji genów podstawowego metabolizmu w *S.lycopersicum* po zakażeniu wirusami ToTV, CMV, TMV i PepMV. Z dziesięciu genów wytypowanych przez Doktoranta do analizy, najmniejszym zmianom podczas infekcji podlegała ekspresja genów *ACT*, *EF1* i *CAC*, natomiast największe zmiany obserwowano w ekspresji genów: *RPL8*, *SAND* i *TBP*. Wyniki tych badań mają ważne znaczenie praktyczne i pozwalają na wybranie odpowiednich genów referencyjnych do badań nad ekspresją genów techniką RT-qPCR. Dane te są przedstawione w publikacji opublikowanej w Journal of Virological Methods (2013, 194, 161-168). W mojej ocenie, dołączenie tej publikacji do cyklu prac przedstawionych jako rozprawa doktorska nie było konieczne. Dane uzyskane w czterech wcześniej omawianych pracach w pełni odpowiadają na postawione na wstępie główne cele badawcze. Uzyskane przez mgra Przemysława Wieczorka wyniki są nowatorskie i bardzo interesujące.

Na uwagę zasługuje znajomość oraz umiejętność posługiwania się przez Doktoranta szerokim wachlarzem najnowszych technik biologii molekularnej i ich wykorzystaniem w badaniach wirusologicznych. Stosowane w pracach metody były doskonale wybrane do wytyczonych celów badawczych. Uważam, że mgr Przemysław Wieczorek jest znakomitym badaczem wirusów roślinnych.

Wyniki badań Doktoranta poza ważnym aspektem poznawczym mają także istotne znaczenie praktyczne.

Ocenianą rozprawę przeczytałam z ogromnym zainteresowaniem i przyjemnością.

W mojej ocenie, rozprawa doktorska mgra Przemysława Wieczorka spełnia wszystkie kryteria określone w Ustawie z 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym (DzU nr 65, poz. 595). Z powyższych względów zwracam się zatem do Wysokiej Rady Instytutu Ochrony Roślin- państwowego Instytutu badawczego w Poznaniu o dopuszczenie mgra Przemysława Wieczorka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, z uwagi na szeroki zakres badań, ich znaczenie poznawcze i praktyczne oraz że wyniki badań Doktoranta zostały opublikowane w czasopiśmie o szerokim zasięgu międzynarodowym, zwracam się do Wysokiej Rady Instytutu Ochrony Roślin Państwowego Instytutu Badawczego o rozważenie możliwości wyróżnienia ocenianej pracy stosowną nagrodą.

  
Prof. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak