

Dr hab. Mirosława Cieślińska, prof. nadzw.
Zakład Fitopatologii
Instytut Ogrodnictwa
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3
96-100 Skierniewice
e-mail: mirosława.cieslinska@inhort.pl
tel 46 8345236

Skierniewice, 20.04.2017

Recenzja pracy doktorskiej mgr Aleksandry Zarzyńskiej-Nowak pt.

**„Diagnostyka oraz analiza molekularna izolatów wirusa pasiastej mozaiki jęczmienia
(*Barley stripe mosaic virus*, BSMV)”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Aleksandry Zarzyńskiej-Nowak została wykonana w Zakładzie Wirusologii i Bakteriologii Instytutu Ochrony Roślin-Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Jezewskiej, prof. nadzw. IOR-PIB oraz dr hab. Beaty Hasiów-Jaroszewskiej, prof. nadzw. IOR-PIB.

Praca obejmuje 119 stron, w tym 101 stron tekstu i zawiera obszerną dokumentację składającą się z 34 rycin i 14 tabel niezbędnych do zilustrowania uzyskanych wyników badań.

Tytuł rozprawy aczkolwiek trafnie dobrany, jest niezbyt zręcznie sformułowany, gdyż znaczenie pojęcia „diagnostyka” nie odnosi się do patogenów, lecz jest rozumiane jako „rozpoznawanie chorób na podstawie ich objawów, badania lekarskiego i wyników analizy laboratoryjnej” (Słownik języka polskiego, PWN).

We **wstępie**, w oparciu o literaturę, Doktorantka krótko przedstawiła najważniejsze zagadnienia dotyczące znaczenia jęczmienia oraz zagrożenia jego upraw przez choroby wirusowe, ze szczególnym uwzględnieniem wirusa pasiastej mozaiki jęczmienia (BSMV). Wirus ten łatwo przenosi się przez nasiona i występuje powszechnie w świecie w uprawie jęczmienia i pszenicy powodując żółknięcie liści, zahamowanie wzrostu i rozwoju porażonych roślin oraz obniżenie ilości i jakości nasion. Straty w plonie mogą istotnie wpływać na obniżenie opłacalności uprawy.

Przegląd literatury światowej świadczy o bardzo dobrej znajomości zagadnienia oraz umiejętności przedstawienia przez Doktorantkę najważniejszych wyników badań prezentowanych w piśmiennictwie. Wiele spośród 207 pozycji cytowanej literatury to publikacje opracowane w ostatnich latach zawierające wyniki najnowszych badań prowadzonych w świecie.

Celem badawczym pracy była charakterystyka właściwości biologicznych i molekularnych wybranych izolatów wirusa pasiastej mozaiki jęczmienia i analiza zmian ultrastrukturalnych w komórkach jęczmienia porażonego wirusem, analiza ewolucji molekularnej wirusa i powiązań filogenetycznych izolatów BSMV wykrytych w Polsce oraz pochodzących z różnych regionów geograficznych świata. Kolejnym ważnym celem było opracowanie czułych metod detekcji, które znalazłyby zastosowanie do wykrywania szerokiego spektrum izolatów wirusa występujących w roślinie zarówno w wysokiej, jak i bardzo niskiej koncentracji.

Materiały i Metody zostały szczegółowo opisane w oddzielnych rozdziałach. Układ ten, w niektórych przypadkach utrudniał nieco zorientowanie się we wzajemnych powiązaniach obu rozdziałów np. w punkcie 5.1. rozdziału Metody z założenia nie ma informacji o tym, że zarówno rośliny, jak i nasiona były testowane DAC-ELISA na obecność wirusa, a z kolei w rozdziale Materiały nie podano jaką metodą prowadzone były testy roślin i nasion. Tytuł ryciny 8 przedstawiającej schemat doświadczenia związanego z analizą molekularną BSMV jest zbyt ogólny - należałoby doprecyzować z jakimi badaniami jest on związany.

W rozdziale **Wyniki**, Doktorantka szczegółowo opisała i zilustrowała przy pomocy fotografii, tabel i wykresów rezultaty swoich badań. Ich zakres był bardzo szeroki i obejmował szereg doświadczeń. Realizację założeń badawczych Doktorantka rozpoczęła od utworzenia, poprzez namnażanie na roślinach jęczmienia w warunkach szklarniowych, kolekcji trzech izolatów BSMV (polskiego łagodnego BSMV-M, polskiego agresywnego BSMV-R i niemieckiego łagodnego BSMV-De-M), które stanowiły materiał badawczy w kolejnych etapach pracy.

Stosując metodę DAC-ELISA, podjęła badania zmierzające do oceny częstości występowania BSMV w nasionach 61 odmian jęczmienia. Obecność wirusa stwierdziła w nasionach 26 z nich, a niskie odczyty absorbancji wskazywały na porażenie łagodnym izolatem BSMV. Uzyskane wyniki dają pogląd o aktualnym stanie porażenia nasion jęczmienia przez BSMV i mogą świadczyć o istnieniu rezerwuaru wirusa w puli europejskich odmian jęczmienia. Nie jest jasne czy wyniki testu ELISA dla 4630 nasion zamieszczone w ostatnim akapicie podpunktu 6.1.1, pkt 6.1 rozdział „Wyniki” mają związek z materiałem opisanym w punkcie 4.2 (rozbieżność w liczbie testowanych nasion).

W toku dalszych badań, Doktorantka przeprowadziła doświadczenia, których celem było ustalenie zakresu roślin gospodarzy wirusa oraz ocena zróżnicowania objawów chorobowych wywoływanych na poszczególnych gatunkach roślin wskaźnikowych przez izolaty łagodne BSMV-M i BSMV-De-M oraz izolat agresywny BSMV-R. Stwierdziła znaczne różnice w

liczbie gatunków roślin porażanych przez poszczególne izolaty wirusa, jak również w reakcji roślin wskaźnikowych na zakażenie BSMV-M, BSMV-R i BSMV-De-M, co wskazuje na ich odmienne właściwości biologiczne. W opisie ryciny 10 g (s. 66) wkraśl się błąd - należy zamienić opisy obu przedstawionych fotografii.

Zróznicowany był również wpływ poszczególnych izolatów wirusa na zmiany strukturalne wywoływane w komórkach porażonych roślin jęczmienia. Izolat łagodny BSMV-M nie powodował zmian ultrastrukturalnych widocznych w mikroskopie elektronowym, zaś pozostałe dwa izolaty wpływały na formowanie się w cytoplazmie mikrociał, a w przypadku BSMV-R dodatkowo na tworzenie się inkluzji błoniastych. Obydwa izolaty, BSMV-R i BSMV-De-M, istotnie zmieniały kształt i budowę organelli komórkowych i w efekcie prowadziły do nekrotyzacji komórek. Wyniki dotyczące zmian ultrastrukturalnych w porażonych komórkach jęczmienia zostały udokumentowane licznymi fotografiami, na których można obserwować zarówno wiriony BSMV występujące pojedynczo lub w agregatach, jak i obecność obcych struktur i deformację poszczególnych organelli komórkowych i nekrotyzację komórek rośliny. Niektóre z poczynionych obserwacji mikroskopowych np. zmiana kształtu mitochondriów nie były dotychczas opisywane i wnoszą nowe dane do literatury światowej w tej dziedzinie. W tej części brakuje wyników dotyczących obserwacji w mikroskopii elektronowej oczyszczonych preparatów wirusa, chociaż w rozdziale Metody, pkt. 5.4.1. znajduje się informacja o takich badaniach. W ostatnim akapicie należałoby podać, który z izolatów wirusa (BSMV-R czy BSMV-De-M) powodował opisane tam zmiany.

Mgr A. Zarzyńska-Nowak przeprowadziła szereg badań dotyczących charakterystyki molekularnej genomu (RNA α , RNA β i RNA γ) wybranych izolatów BSMV. W tym celu, po izolacji całkowitego RNA, amplifikacji i klonowaniu oczyszczonych produktów RT-PCR, przeprowadzono sekwencjonowanie plazmidowego DNA izolatów BSMV-R, BSMV-De-M i BSMV-M/R. Ta część pracy narażała Doktorantkę pewne problemy wynikające z niskiej koncentracji cząstek łagodnego izolatu BSMV-M w tkankach porażonych roślin. Odczytanie pełnej sekwencji nukleotydów tego izolatu było możliwe dopiero po amplifikowaniu, klonowaniu i sekwencjonowaniu krótkich fragmentów, które następnie po edycji zostały skompilowane przy użyciu odpowiednich programów bioinformatycznych. Wykonując tę część badań, Doktorantka wykazała się pracowitością, cierpliwością i determinacją w dążeniu do celu, które powinny cechować pracownika nauki. Za warte podkreślenia osiągnięcie mgr Zarzyńskiej-Nowak uważam również zaprojektowanie starterów, które były wykorzystywane do amplifikacji fragmentów genomu wirusa.

Doktorantka przedstawiła organizację genomów badanych izolatów BSMV, w których na podstawie odczytanych sekwencji, wyodrębniła siedem regionów kodujących. Porównując uzyskane sekwencje badanych izolatów między sobą oraz z sekwencjami genomów szczepów BSMV zaczerpniętymi z bazy danych GenBank, stwierdziła różnice w wielkości każdego z trzech cząsteczek RNA wirusa. Wynikały one z występowania różnej długości delekcji lub insercji w obrębie RNA β lub RNA γ , albo też długości ogona poli(A). Ten wątek badań był wartościowy, a wyniki analiz pozwoliły na poznanie zróżnicowania genetycznego nie tylko rodzimych izolatów BSMV, ale również tych pochodzących z odległych rejonów świata. W pierwszej kolumnie tabel 8 i 9 (s. 76) odnoszących się do tej części wyników należałoby dodać nagłówek „Izolat”.

W kolejnym etapie badań, analizując pełne sekwencje genomu izolatów BSMV, mgr A. Zarzyńska-Nowak stwierdziła obecność mutacji wspólnych i różnicujących izolaty BSMV-R, BSMV-M i BSMV-De-M i na tej podstawie określiła regiony najbardziej zmienne (kodujące białka α i γ a) i konserwatywne (kodujące białka TGBp2 i γ b). Wykazała, że region kodujący białko TGBp2 jest najbardziej zachowawczy dla wszystkich analizowanych izolatów BSMV, co było istotne przy projektowaniu starterów wykorzystywanych w dalszych badaniach mających na celu opracowanie metod wykrywania jak najszerszego spektrum izolatów BSMV. Biorąc pod uwagę stosunkowo niewielką liczbę (8) mutacji niesynonimicznych i synonimicznych (17) występujących w sekwencji polskich izolatów BSMV-R i BSMV-M, Doktorantka postawiła tezę, że na zróżnicowanie właściwości biologicznych izolatów BSMV może wpływać nawet pojedyncza substytucja nukleotydu, co w dyskusji zestawiała z wynikami analogicznych analiz dotyczących wpływu mutacji punktowych na zmianę właściwości biologicznych związanych np. z infekcyjnością wirusów, czy przełamaniem odporności. Mgr A. Zarzyńska-Nowak posłużyła się przykładem pojedynczych mutacji występujących w regionach kodujących białka α i γ a izolatu BSMV-M, które mogą wpływać na infekcyjność oraz namnażanie się wirusa lub mutacje punktowe wykryte w regionie kodującym białka TGB1 i TGB3, które mogą mieć oddziaływać na międzykomórkowy transport BSMV. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki prac dotyczących możliwości wpływu mutacji w genetycznych na zróżnicowanie właściwości biologicznych izolatów BSMV, mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań z zastosowaniem techniki ukierunkowanej mutagenezy, których celem będzie identyfikacja genetycznych determinant związanych z występowaniem określonych objawów chorobowych na roślinach oraz ich wpływu na właściwości biologiczne wirusa.

Ważnym elementem badań mgr A. Zarzyńskiej-Nowak była analiza ewolucji molekularnej łagodnych izolatów BSMV w efekcie przedłużonego pasażowania w roślinach jęczmienia i wynikających z tego możliwości powstawania wariantów wirusa o właściwościach biologicznych odmiennych od izolatu wyjściowego. W efekcie tych prac, Doktorantka uzyskała nowy wariant genetyczny BSMV-M/R, który wykazywał wysokie podobieństwo genetyczne w stosunku do izolatu łagodnego i agresywnego, lecz w odróżnieniu od wyjściowego izolatu BSMV-M, charakteryzował się większą koncentracją wirionów, łatwo przenosił się mechanicznie, zaś słabo przez nasiona. Doktorantka postawiła tezę, że BSMV wykazuje wysoki potencjał ewolucyjny, co w konsekwencji może prowadzić do powstawania nowych wariantów wirusa o zróżnicowanych właściwościach genetycznych i biologicznych.

Mgr A. Zarzyńska-Nowak przeprowadziła również badania obejmujące analizy występowania rekombinacji dla pełnych sekwencji izolatów BSMV. Wykazała, że oprócz opisanego w literaturze izolatu BSMV-CV17, izolat BSMV-De-M jest również rekombinantem. Oznaczyła miejsce rekombinacji w genie białka σ BSMV-De-M i stwierdziła, że 537 nukleotydowy fragment sekwencji tego regionu pochodził z izolatu BSMV-CV42.

Na podstawie wyników analizy filogenetycznej regionów kodujących mgr A. Zarzyńska-Nowak stwierdziła bliskie pokrewieństwo genetyczne polskich izolatów BSMV-M, BSMV-R i BSMV-M/R. Mgr A. Zarzyńska-Nowak przeprowadziła analizę rodzaju i wpływu presji selekcyjnej kształtującej wszystkie regiony kodujące, które mogłyby w istotny sposób decydować o właściwościach izolatów wirusa. Nie stwierdziła wpływu pozytywnej presji selekcyjnej na populację izolatów BSMV, lecz wykazała, że większość kodonów znajduje się pod jej neutralnej wpływem, a tylko 2,6% z nich była poddawana negatywnej presji selekcyjnej.

Zmienność genetyczna wirusów może mieć istotny wpływ na skuteczność ich wykrywania oraz kontroli i ograniczania występowania. Dlatego też ważnym wątkiem pracy doktorskiej mgr A. Zarzyńskiej-Nowak były badania dotyczące opracowania czułych i specyficznych metod wykrywania wirusa, alternatywnych do metody ELISA i konwencjonalnej techniki RT-PCR. Doktorantka wykazała, że technika IC-real-time RT-PCR z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał skierowanych na BSMV umożliwiała wykrywanie wirusa ze stukrotnie większą czułością, niż RT-PCR. Z kolei czułość izotermalnej metody amplifikacji kwasów nukleinowych (RT-LAMP) w badaniach Doktorantki była 10-krotnie wyższa w porównaniu z RT-PCR, a prostota i krótki czas przeprowadzenia analizy oraz brak konieczności posiadania specjalistycznego sprzętu jest atutem tej metody. Mgr A. Zarzyńska-Nowak wyraziła opinię, że obie techniki mogą znaleźć zastosowanie do wykrywania

szerokiego spektrum izolatów BSMV, również tych występujących w niskiej koncentracji w tkankach roślinnych. Badania Doktorantki w tym zakresie mają charakter nowatorski, są bardzo ważne z poznawczego i praktycznego punktu widzenia.

Dyskusja została przeprowadzona w sposób poprawny i odnosiła się do problemów badawczych zawartych w pracy. Mgr A. Zarzyńska-Nowak wykazała się znajomością tematyki związanej z chorobami wirusowymi roślin, a szczególnie z badaniami dotyczącymi wirusów zbóż. Posiadaną wiedzę wykorzystała przy szczegółowej analizie uzyskanych wyników w zestawieniu z dostępną literaturą. Do tej części pracy nie mam zastrzeżeń merytorycznych, a jedynie drobne uwagi. Na stronie 89, w trzecim akapicie dotyczącym zmian w ultrastrukturze komórek należy podać które dwa izolaty je powodowały. Ostatnie zdanie na stronie 99 jest niezrozumiałe.

Na zakończenie rozprawy, mgr A. Zarzyńska-Nowak zamieściła sześć **wniošków** wynikających z przeprowadzonych badań, które trafnie i zwięźle ujmują najważniejsze osiągnięcia pracy.

Za najważniejsze osiągnięcie naukowe będące wynikiem badań prowadzonych przez mgr A. Zarzyńską-Nowak uważam:

- wykazanie zróżnicowania właściwości biologicznych i molekularnych badanych izolatów wirusa pasiastej mozaiki jęczmienia
- wykazanie zmian ultrastrukturalnych wywoływanych przez poszczególne izolaty BSMV w komórkach roślin jęczmienia
- zidentyfikowanie regionów zmiennych i zachowawczych w genomie izolatów BSMV
- wykazanie wysokiego potencjału ewolucyjnego BSMV, którego wynikiem może być powstawanie nowych odmiennych genetycznie i biologicznie wariantów wirusa
- opracowanie czułych i specyficznych metod IC real-time RT-PCR i RT-LAMP do wykrywania szerokiego spektrum izolatów BSMV

Doktorantka nie ustrzegła się drobnych usterek o charakterze redakcyjnym oraz używania skrótów myślowych np.: rodzaj izolatu (s. 21), przenoszące nasiona jęczmienia (s. 21), ilość roślin (s. 29), zjawisko zajścia rekombinacji (s. 30), metod molekularnych wykrywających BSMV (s. 33), startery...amplifikujące (s. 41), RNA wyizolowane z potwierdzonych w ten sposób roślin (s. 64), obecność porażenia BSMV wykryto (s. 65), pokrewieństwo sekwencji pełnych genomów (s. 80), wynik pozytywny obserwowany (s. 86), jest zdolny do zachowania zdolności (s. 87), pewien rezerwuar wirusa (str. 87), porażał systemicznie tytoń, co jest

charakterystycznym objawem opisanym w literaturze (s. 88), nekrotyczne symptomy (s. 93), podobieństwo izolatów...których procentowe wartości podobieństwa (s. 98).

Wskazane w recenzji komentarze i uwagi nie mają wpływu na merytoryczną ocenę pracy i nie obniżają jej walorów naukowych. Rozprawę doktorską mgr Aleksandry Zarzyńskiej-Nowak oceniam wysoko. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wnoszą nowe wartości w dziedzinę wirusologii roślinnej i poszerzają wiedzę na temat wirusa pasiastej mozaiki jęczmienia. Doktorantka, realizując cele badawcze wykazała konsekwencję w działaniu, systematyczność, cierpliwość, dojrzałość naukową oraz umiejętność analizowania i interpretacji uzyskanych wyników, a także dowiodła znajomości technik badawczych i programów bioinformatycznych wykorzystywanych w nowoczesnej wirusologii.

Podsumowując, uważam że rozprawa doktorska mgr Aleksandry Zarzyńskiej-Nowak odpowiada warunkom stawianym rozprawom doktorskim. W związku z tym stawiam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Ochrony Roślin - Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Zarzyńskiej-Nowak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na szeroki zakres prac, zastosowanie różnorodnych i nowoczesnych metod i technik badawczych oraz uzyskanie wartościowych wyników o znaczeniu poznawczym i praktycznym wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

Handwritten signature