

Poznań 3.09.2017

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

O C E N A

rozprawy doktorskiej Pani JULII MINICKIEJ
Ewolucja molekularna wirusa mozaiki pepino (*Pepino mosaic virus*) i jej wpływ na wirulencję wirusa

wykonanej w Zakładzie Wirusologii i Bakteriologii Instytutu Ochrony Roślin
Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu
pod kierunkiem Pani dr hab. Beaty Hasiów-Jaroszewskiej – prof. nadz. IOR-
PIB w Poznaniu
oraz Pani dr Beaty Komorowskiej z Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach

Wirus mozaiki pepino (*Pepino mosaic virus*) należy do groźnych patogenów powodujących duże straty w uprawach pomidorów szklarniowych, jak również innych roślin o ważnym znaczeniu gospodarczym, tj. *Solanum melongena* L., *Nicotiana benthamiana*, czy *Datura inoxia* Mill. Znane są jego różne warianty charakteryzujące się odmiennymi właściwościami biologicznymi. Uważa się, że odpowiedzialne są za to częste mutacje w genomie wirusa oraz brak mechanizmów umożliwiających ich korektę. Materiał genetyczny wirusa stanowi pojedyncza nić RNA o polarności dodatniej, zbudowana z około 6410 nt, kodująca: RNA zależną, RNA polimerazę o masie cząsteczkowej około 163 kDa, białka TGBp1-3 (o masie 26 kDa, 14 kDa i 9kDa) biorącego udział w przemieszczaniu się wirusa oraz białka płaszcza (CP) o masie cząsteczkowej 25 kDa. Na końcu 5' nici genomowej występuje struktura kap oraz krótki rejon niekodujący, natomiast na końcu 3' – trakt poliA oraz krótka sekwencja niekodująca, odpowiedzialna za regulację replikacji RNA i jego translację. Dotychczas zidentyfikowano 5 szczepów wirusa: europejski (EU), peruwiański (LP), południowoperuwiański (PES), amerykański 1 (US1) oraz chilijski 2 (CH2). W kolekcji Zakładu Wirusologii i Bakteriologii Instytutu Ochrony Roślin-PIB w Po-

znaniu znajdują się liczne izolaty wirusa PepMV należące do szczepu CH2 oraz dwa izolaty zaliczane do szczepu EU.

W Instytucie Ochrony Roślin w Poznaniu wyodrębniono trzy główne warianty wirusa CH2 – łagodny, żółtaczkowy oraz nekrotyczny – na podstawie objawów chorobowych wywoływanych w roślinach pomidora po zakażeniu. Scharakteryzowano także mutacje w genomie wirusa powodujące występowanie objawów chorobowych nekrotycznych i odpowiedzialnych za żółknienie liści (żółtaczkowych) oraz wpływ czynników środowiskowych na ich powstanie. Wirus ten w ostatnich latach stał się bardziej infekcyjny i dotychczas nie stwierdzono odmian pomidora odpornych na zakażenie.

Dlatego, podjęcie przez Panią mgr Julię Minicką badań nad mechanizmami molekularnymi odpowiedzialnymi za powstawanie nowych wariantów genetycznych wirusa i ich rozprzestrzenianie się w środowisku uważam za słuszne i w pełni uzasadnione. O ważności tego problemu świadczy również przyznanie na te badania dwóch grantów, odpowiednio przez – Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Narodowe Centrum Nauki.

Doktorantka realizując cel tych badań, postanowiła łagodny polski izolat wirusa PepMV-P22, wyizolowany wcześniej w Zakładzie Wirusologii i Bakteriologii IOR-PIB przez promotora rozprawy, pasażować w roślinach różnych gatunków (z rodziny *Solanaceae* oraz w pomidorach odmiany: *Beta Lux*, *Moneymaker*, *Malinowy Ożarowski* oraz w roślinie *Datura inoxia*) dwudziestokrotnie, co 10 dni. Uzyskane po 20 cyklach pasażowania warianty genetyczne wirusa mgr Julia Minicka dokładnie scharakteryzowała, opierając się na analizie sekwencji kodującej białko płaszczka wirusa oraz białko TGBp3, jak również opisała objawy wywołane przez te wirusy na roślinach. Analiza sekwencji, z zastosowaniem programu BioEdit obu badanych genów, różnych wariantów wirusa, wykazała obecność 143 substytucji nukleotydów (61 substytucji synomicznych i 82 substytucje niesynomiczne), w porównaniu z izolatem wyjściowym. 48 mutacji występowało w genie kodującym TGB3, a 95 – w genie CP. Z tego 5 mutacji w genie płaszczka wirusa i 7 w genie kodującym białko TGBp3 powstało podczas pasażowania wirusa w różnych gospodarzach równocześnie. Większość zidentyfikowanych zmian była zlokalizowana na powierzchni białek. Analiza presji selekcyjnej populacji wirusa Pep za pomocą programu MEGA5 wykazała, że liczne kodony kodujące białko płaszczka i TGBp3 znajdują się pod negatywną presją selekcyjną, natomiast 42 kodony w genie *CP* i 21 w

genie *TGBp3* znajdowały się pod presją pozytywną. Żaden z analizowanych kodonów nie był pod neutralną presją selekcyjną. Badania te potwierdziły także obecność mutacji w genie kodującym *TGBp3*, wcześniej zidentyfikowanej przez Panią prof. B. Hasiów-Jaroszewską i współautorów. Mutacja ta jest uważana za genetyczną determinantę nekrotycznych objawów chorobowych. Wyniki tych badań wskazują, że polski łagodny izolat wirusa PepMV nie jest stabilny genetycznie, a powstające w jego genomie mutacje spontaniczne mogą prowadzić do pojawienia się bardziej agresywnych jego wariantów.

Wyniki niniejszych badań Doktorantka przedstawiła w pracy, zatytułowanej *Molecular evolution of Pepino mosaic virus during long-term passaging in different host and its impact on virus virulence* (Minicka J., Rymelska N., Elena SF., Czerwonec A., Hasiów-Jaroszevska B.), opublikowanej w *Annals of Applied Biology* 166 (2015, 389-401). W toku dalszych prac Doktorantka postanowiła zbadać, jak inne mutacje losowo wprowadzone do genomów łagodnych szczepów wirusa PepMV-P22 (szczep HH2) i PepMV-P11 (szczep EU) wpływają na replikację wirusa i objawy chorobowe wywołane w roślinach zakażonych wirusem. W tym celu, stosując mutagenезę ukierunkowaną, mgr Julia Minicka do genomu PepMV-P22 wprowadziła 22 losowe mutacje oraz 3, które wcześniej były zidentyfikowane jako odgrywające rolę w powstawaniu objawów chorobowych na roślinach: żółtaczkowych lub nekrotycznych. Ponadto, pięć z powyższych mutacji Doktorantka wprowadziła do łagodnego izolatu wirusa PepMV-P11. Objawy wywoływane na roślinach po zakażeniu różnymi wariantami genetycznymi wirusa były zróżnicowane – od letalnych do łagodnej mozaiki, deformacji blaszek, czy ich zwijania się. Poza tym, potwierdziły wcześniejsze dane wskazujące, że za obserwowane na roślinach zmiany po ich zakażeniu różnymi wariantami wirusa Pep-MV odpowiadają mutacje w genie kodującym białko TGB3 i CP (w obu szczepach wirusa).

Wyniki badań mgr Julii Minickiej nad replikacją wirusa wykazały, że spośród wprowadzonych mutacji 18 miało wpływ neutralny na replikację wirusa, dwie szkodliwe, a 6 powodowało wpływ korzystny. Zależało to również od genu oraz pozycji, w której mutacja została wprowadzona. Najkorzystniej na replikację wirusa wpływały mutacje w genie kodującym *RdRp*, najmniej – w genie *TGBp1* i *CP*. Ponadto, wpływ tych mutacji zależał od podłoża genetycznego, czy szczepu wirusa CH2 lub EU. Stosunkowo duża tolerancja badanych wirusów na wprowadzone mutacje, jak też ich wpływ na replikację wirusa i ich wirulencję wskazuje na zróżnicowane me-

chanizmy kierujące ewolucją badanych wirusów oraz istotnie wpływających na to warunków środowiskowych. Wyniki tych badań Pani mgr Julia Minicka przedstawiła w pracy: *Strain- dependent mutational effects for pepino mosaic virus in a natural host* (Minicka J., Elena SF., Borodynko-Filas N., Rubiś B., Hasiów-Jaroszewska B.), opublikowanej w *BMC Evolutionary Biology* (2017, 17:67 DOI 10.1186/s12862-017-0920-4).

W toku dalszych badań nad wirusami Pep-MV mgr Julia Minicka postanowiła wyjaśnić, jak niektóre z wprowadzonych mutacji wpływają na ultrastrukturę komórek i tkanek zakażonych wirusem roślin. Do dalszych badań wybrała trzy izolaty wirusa: PepMV-P22 – izolat łagodny, PepMv-P19 – izolat nekrotyczny oraz PepMV-P5 – izolat żółtaczkowy. Badania ultrastrukturalne skrawków tkanek roślin zakażonych infekcyjnymi kopiami wybranych izolatów wykazały obecność cząstek wirusa w różnych przedziałach komórkowych, w komórkach różnych typów (epidermiach, komórkach miękiszowych, elementach sitowych floemu). Zmiany w komórkach były zróżnicowane – w zależności od użytego do zakażenia izolatu. Najsilniejszą korelację pomiędzy zmianami ultrastrukturalnymi w komórce obserwowano w komórkach roślin zakażonych izolatem wirusa nekrotycznego. Potwierdza to wcześniejsze obserwacje, że pojedyncze zmiany w genomie wirusa PepMv istotnie wpływają na przebieg infekcji, replikację wirusa, jego wirulencję i zmiany chorobowe w roślinie. Szczegółowy opis tych zmian, jak również ich wpływ na ultrastrukturę komórek roślinnych oraz objawy chorobowe Doktorantka przedstawiła i udokumentowała na fotografiach w trzeciej pracy cyklu składającego się na Jej rozprawę doktorską: *Ultrastructural insights into tomato infections caused by three different pathotypes of Pepino mosaic virus and immunolocalization of viral coat proteins* (Minicka J., Otulak K., Garbaczewska G., Pospieszny H., Hasiów-Jaroszewska B.) opublikowanej w *Micron* (79, 2015, 84-92).

Wirus Pep-MV z uwagi na silną szkodliwość znajduje się na liście alertowej A2 Europejskiej i Śródziemnomorskiej Organizacji Ochrony Roślin (EPPO), jednakże brakuje praktycznie środków zapobiegających jego coraz szerszemu rozprzestrzenianiu się w środowisku. Z tego względu mgr Julia Minicka postanowiła sprawdzić, czy badane przez nią polskie łagodne izolaty tego wirusa (PepMV-P22, PepMV-P19, PepMV-P5-IY oraz wariant PepMV-P22K67E, z mutacją odpowiedzialną za objawy nekrotyczne zakażonych wirusem roślin) mogą być wykorzystane do ochrony roślin pomidora przeciwko innym izolatom powodującym zróżnicowane objawy na roślinie.

nach. Zjawisko ochrony krzyżowej było obserwowane jedynie w przypadku wykorzystania PepMV-P22 przeciwko PepMV-P5-IY, natomiast ochrona krzyżowa została przełamana w przypadku PepMV-P19 oraz Pep MV-P22K67E. Wyniki tych badań Doktorantka przedstawiła w pracy: *Cross-protection between different pathotypes of Pepino mosaic virus representing Chilean 2 genotype* (Hasiów-Jaroszewska B., Minicka J., Pospieszny H.), opublikowanej w *Acta Sci Pol., Hortorum Cultus* (13(5), 2014,177-185).

W skład pracy doktorskiej mgr Julii Minickiej wchodzi także praca przeglądowa: *Rapid evolutionary dynamics of the Pepino mosaic virus – status and future perspectives* (Minicka J., Hasiów-Jaroszewska B., Borodynko-Filas N., Pospieszny H., Hanssen I.M.), w której zostały podsumowane dotychczasowe dane dotyczące ewolucji i zmienności wirusa Pep-MV, zmiany w strukturze populacji wirusa w ostatnich latach, czynniki genetyczne decydujące o wirulencji wirusa, objawy chorobowe roślin, sposoby jego detekcji oraz metody ochrony roślin przed zakażeniem. Duży wpływ na wyniki tych badań mają dane uzyskane przez mgr Julię Minicką podczas realizacji pracy doktorskiej oraz współautorów przedstawionych publikacji.

Sumaryczny współczynnik wpływu prac składających się na rozprawę doktorską mgr Julii Minickiej wynosi 7,714, co odpowiada 140 pkt. MNiSW. Mimo że wszystkie prace Doktorantki są wieloautorskie, nie mam najmniejszych wątpliwości, że udział mgr Julii Minickiej w badaniach molekularnych był dominujący, co potwierdzają ich współautorzy w załączonych do publikacji oświadczeniach. W czterech z cyklu prac Doktorantka jest pierwszym autorem. Wszystkie zostały opublikowane w czasopiśmie o szerokim zasięgu międzynarodowym, co wskazuje na ich wysoki poziom merytoryczny oraz istotne znaczenie naukowe. Do cyklu publikacji składających się na rozprawę doktorską mgr Julii Minickiej dołączone jest streszczenie rozprawy w języku polskim i angielskim, krótkie wprowadzenie na temat wirusów Pep-MV, jasno wytyczone cele pracy oraz opis metod stosowanych w badaniach i wyniki badań opublikowanych w załączonym cyklu prac stanowiącym rozprawę doktorską. Dane te przygotowane zostały bardzo starannie. Opis wirusa Pep-MV oraz przedstawienie celów badawczych świadczą o dobrym przygotowaniu Doktorantki do badań i znakomitym zrozumieniu badanych zagadnień.

Rozprawę doktorską Pani mgr Julii Minickiej oceniam bardzo wysoko. Użyte przez Doktorantkę dane są nowatorskie i wnoszą szereg istotnych informacji dotyczących ewolucji molekularnej wirusa mozaiki Pepino, roli mutacji w genomie

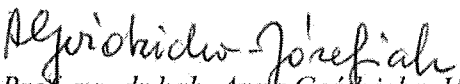
wirusa i ich wpływu na jego replikację oraz wirulencję. Ponadto, dane te mogą być wykorzystane do opracowania odpowiednich metod wykrywania wirusa i ochrony roślin przed zakażeniem.

Zatem, praca ta, poza aspektem poznawczym, ma istotne znaczenie praktyczne. W badaniach Doktorantka wykazała się znajomością oraz umiejętnością wykorzystania najnowszych technik biologii molekularnej i wirusologii. Wszystkie techniki badawcze były odpowiednio dobrane do starannie wytyczonych celów badawczych, konsekwentnie realizowanych.

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Julii Minickiej 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 mgr Julii Minickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, mając na uwadze ważne znaczenie badań mgr Julii Minieckiej dla rozwoju wirusologii roślin, ich znaczenie poznawcze, jak również praktyczne dla ochrony roślin, zwracam się do Wysokiej Rady IOR PIB w Poznaniu o wyróżnienie ocenianej rozprawy stosowną nagrodą.


Prof. zw. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak