



INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
PLANT BREEDING AND ACCLIMATIZATION INSTITUTE
NATIONAL RESEARCH INSTITUTE
Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie,
<http://www.ihar.edu.pl>, <http://ziemniak-bonin.pl>,
REGON 000079480, NIP 529-000-70-29, KRS 0000074008
Nr konta: BZ WBK III O/Koszalin 36 1500 1096 1210 9002 5721 0000

dr hab. Krzysztof Treder
Z-ca Kierownika Oddziału
IHAR-PIB w Boninie,
Bonin 3 76-009 Bonin
e-mail: k.treder@ihar.edu.pl
tel. 94 342-30-31 w. 207

Bonin, 20.11.2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Barbary Wrzeńskiej-Krupy

„Badanie molekularnych mechanizmów odpowiedzi *Nicotiana benthamiana* na infekcję wirusem karłowatości orzecha ziemnego (Peanut stunt virus, PSV) i jego satelitarnym RNA”

Uzasadnienie wykonania recenzji

Rozprawa doktorska mgr inż. Barbary Wrzeńskiej-Krupy została wykonana w Instytucie Ochrony Roślin - Państwowym Instytucie Badawczym w Poznaniu pod opieką promotora dr hab. Aleksandry Obrępańskiej-Stęplowskiej, prof. IOR-PIB. Recenzję wykonałem w związku z powołaniem mojej osoby na recenzenta w postępowaniu doktorskim mgr inż. Barbary Wrzeńskiej-Krupy uchwałą Rady Naukowej IOR-PIB w Poznaniu i na podstawie pisma z dnia 10.10.2024 r. przesłanego przez Sekretarza RNA IOR-PIB dr Annę Maćkowiak-Sochacką.

Jednocześnie oświadczam, że tematyka rozprawy jest zgodna z moją specjalizacją naukową, nie jestem współautorem prac naukowych Doktorantki, nie prowadziłem i nie prowadzę wspólnie prac naukowych i jak dotąd nie brałem udziału w postępowaniach o awans naukowy Doktorantki.

Formalna ocena rozprawy

Rozprawa doktorska pani mgr inż. Barbary Wrzesińskiej-Krupy liczy 205 stron, włączając w to: kartę tytułową, podziękowania, spis treści, wykaz monotematycznych oryginalnych prac będących przedmiotem rozprawy doktorskiej, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, siedem rozdziałów stanowiących główną część dysertacji, spis literatury, opis źródeł finansowania przeprowadzonych badań oraz załączniki w postaci kopi pięciu oryginalnych publikacji Doktorantki będących przedmiotem rozprawy doktorskiej z dołączonymi materiałami uzupełniającymi (jeżeli były) oraz oświadczeniami Doktorantki i współautorów o procentowym udziale w poszczególnych publikacjach, z których wynika, że była ona w nich wiodącym autorem.

Główny opis rozprawy złożony jest z siedmiu rozdziałów, z których dwa zawierają podrozdziały. Struktura obejmuje (1) Wstęp, (2) Hipotezy badawcze, (3) Cele pracy, (4) Metodologię, zawierającą trzynaście podrozdziałów (5) Omówienie wyników pięciu prac wchodzących w skład rozprawy, z pięcioma podrozdziałami dedykowanymi każdej publikacji, (6) Podsumowanie, (7) Wnioski.

Rozdziały od Streszczenia po Literaturę stanowią właściwą dysertację, która jest zbiorczą syntezą cyklu publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej. Takie podejście jest jednocześnie twórcze, jak i dodatkowo potwierdza, że cykl publikacji w istocie tworzy jedno, wspólne dzieło. Kolejność manuskryptów odzwierciedla logiczny ciąg badań, co jest wyraźnie widoczne w ich wspólnych omówieniach. Literatura obejmuje 63 pozycje, z których większość to publikacje anglojęzyczne. Ponad połowę literatury stanowią pozycje (66,7%), które ukazały się w ciągu ostatnich 25 lat, a około 29% w ciągu ostatniego dziesięciolecia. Doktorantka, sięgając do kluczowych, starszych źródeł, w swoich badaniach korzystała przede wszystkim z najnowszej literatury przedmiotu. Bogactwo źródeł literaturowych i ich dobór, świadczą o tym, że Doktorantka dokonała gruntownego przeglądu literatury obejmującej kluczowe aspekty badawcze, związane z przedmiotem rozprawy doktorskiej. Strukturę rozprawy uważam za logiczną, przejrzystą i bardzo dobrze przemyślaną. Pozytywnie oceniam rozprawę pod względem formalnym.

Ocena merytoryczna

Streszczenie w języku polskim i angielskim podaje syntetyczny opis prac i wyników uzyskanych przez Doktorantkę. Zarówno w spisie treści jak i w nagłówku Doktorantce wkradł się chochlik drukarski w tytule – zamiast Streszczenie jest Strzeszczenie. Merytorycznie streszczenie jest napisane bardzo dobrze. Syntetycznie i bardzo ciekawie przedstawia wyniki badań wykonanych w ramach rozprawy.

We **Wprowadzeniu** Autorka podała ogólne informacje dotyczące wirusów roślinnych, w tym mechanizmów leżących u podłoża powstawania widocznych objawów chorobowych, definiujących wirusy jako, jak to słusznie Autorka ujęła: „patogeny molekularne”. Omawiając sposób w jaki wirusy wykorzystują komórki roślinne i ich kompartmenty do replikacji oraz jak oddziałują na metabolizm rośliny i w jaki sposób rośliny bronią się przed wirusami na poziomie molekularnym Autorka nakreśliła przejrzyste tło, wprowadzające płynnie czytelnika w przedmiot badań. W dalszej części prezentuje rodzaj cucumovirus oraz bardziej szczegółowo omawia wirus karłowatości orzecha ziemnego (ang. peanut stunt virus, PSV) podając najważniejsze informacje z zakresu biologii i znaczenia tego wirusa w uprawach rolniczych. Następnie dokonuje molekularnej charakterystyki PSV i jego satelitarnego RNA (satRNA), omawia szczepy wirusa i rolę satRNA w biologii wirusa, w tym w jego transmisji przez mszyce. Tę część Wprowadzenia ilustruje przejrzysty schemat interakcji wirus pomocniczy – satelitarny RNA – roślina żywicielska, przedstawiony na rys. 1. Podsumowanie kończy uzasadnienie podjętych w rozprawie badań.

W rozdziale **Hipotezy badawcze**, Doktorantka formułuje cztery rozbudowane hipotezy badawcze. Pierwsza z nich zakłada, że proteom i fosfoproteom *N. benthamiana* będzie reagował silniej na wczesnym etapie infekcji samym PSV-P, niż na koinfekcję wirusem w towarzystwie satRNA, z uwagi na fakt, że satRNA łagodzi objawy infekcji i jej przebieg oraz, że te różnice będą związane z działaniem kompartmentów subkomórkowych. Hipoteza nr 2 zakłada, że (1) wczesna infekcja PSV-P oraz PSV + satRNA będzie w różny sposób wpływać na ekspresję krótkich RNA (sRNA) które regulują poziomy transkryptów mRNA związanych z rozwojem komórek roślinnych, ich metabolizmem podstawowym, oraz odpowiedzią na infekcję. (2) sRNA, których poziom będzie istotnie zmieniony pod wpływem infekcji będą regulować różne czynniki związane z kompartmentami komórkowymi i procesami biologicznymi w sposób zależny od braku lub obecności satRNA w trakcie infekcji PSV-P. (3)

Pod wpływem infekcji wirusem powstaną sRNA specyficzne dla jego genomowych RNA, dla których docelowymi będą również transkrypty kodujące białka roślinne zaangażowane w fosforylację i odpowiedź na bodziec. W hipotezie nr 3, Doktorantka zakłada, że obecność satRNA modyfikuje poziomy ekspresji genów, a także aktywuje dodatkowe procesy, przez co modyfikuje przebieg patogenez. Hipoteza nr 4 zakłada, że efektem działania satRNA jest zwiększona transmisja PSV-P przez mszyce, co jest korzystne ewolucyjnie dla wirusa i samego satRNA. Mechanizm tego zjawiska ma polegać na łagodzeniu wpływu wirusa na roślinę, przez co jest ona bardziej atrakcyjna dla mszyc, a tym samym zwiększa szansę na transmisję wirusa.

W rozdziale **Cele pracy** Doktorantka formułuje główny cel pracy i definiuje siedem celów szczegółowych, mających weryfikować postawione hipotezy, tym samym prowadząc do realizacji celu głównego. Głównym celem pracy było zbadanie wpływu satelitarnego RNA na przebieg infekcji PSV-P na poziomie molekularnym, poznanie molekularnego podłoża interakcji wirusa z rośliną oraz transmitującym go wektorem (mszycą), jak również mechanizmów, za pomocą których satelitarny RNA modyfikuje te interakcje z korzyścią dla sukcesu ewolucyjnego wirusa, a co za tym idzie – zwiększenia szans na własne przetrwanie w środowisku. Cele szczegółowe uważam za precyzyjne i trafne, pozwalające na właściwą weryfikację postawionych hipotez.

W rozdziale **Metodyka** Doktorantka w trzynastu podrozdziałach omówiła metody, które stosowała w swoich badaniach, wskazując w każdym podrozdziale publikację z cyklu wchodzącego w skład rozprawy, w której znajduje się szczegółowy opis metodyczny. Tu w podrozdziale 4.2 wkradł się slang laboratoryjny – Doktorantka napisała „totalny RNA” a powinno być „całkowity RNA”, którego to sformułowania używa poprawnie w innych miejscach rozprawy. Dużą zaletą tej części rozprawy jest to, że pozawala ona w sposób klarowny prześledzić metody, narzędzia i rozwiązania wykorzystane przez Doktorantkę w trakcie jej badań bez sięgania do metodyki w publikacjach. Z jednej strony ułatwia to czytanie, ponadto pozwala na głębsze zrozumienie opisu wyników.

Rozdział **Wyniki opublikowane w cyklu prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej**, jest złożony z pięciu podrozdziałów, z których każdy jest dedykowany opisowi jednej z publikacji wchodzących w skład rozprawy w logicznej kolejności tych publikacji.

W pierwszej publikacji Autorka opracowała i zoptymalizowała tworzenie klonów infekcyjnych PSV P i satRNA z wykorzystaniem agroinfiltracji *N. benthamiana*. Efektywność opracowanego systemu potwierdziła infekując sokiem z *N. benthamiana* za pomocą metod RT-

PCR i Western blotting oraz za pomocą mikroskopii elektronowej. Ponadto sok z agroinfiltrowanych roślin był infekcyjny – Doktorantka efektywnie pasażowała wirusa na rośliny *N. benthamiana*, fasoli i grochu. Za pomocą analiza sekwencji agroinfekcyjnych kopii P SVP i satRNA Autorka wykazała pewną zmienność w regionach niekodujących i w obrębie genomu kodującym białko płaszczka wirusa, podczas gdy satRNA był identyczny z wyjściową sekwencją.

W kolejnej pracy Autorka badała jakie zmiany zachodzą na wczesnym etapie infekcji w proteomie i fosfoproteomie roślin *N. benthamiana* porażonych samym wirusem oraz infekowanych jednocześnie PSV-P i satRNA w porównaniu do zdrowych lub porażonych samym wirusem roślin. Oprócz typowych dla infekcji wirusowych zmian w fotosyntezie i metabolizmie węgla, Doktorantka zaobserwowała zmiany w poziomie białek i fosfoprotein związanych z metabolizmem podstawowym (translacja, fotosynteza), przekazywaniem sygnałów (obniżenie akumulacji białek związanych z sygnalizacją komórkową) oraz odpowiedzią obronną (białka związane z proteasomem). Infekcja samym PSV P obniżała poziom fosforylacji, w tym poziom białek zdolnych do autofosforylacji i zaangażowanych w transdukcję sygnału. Infekcja samym wirusem obniżała akumulację białek związanych z procesami sygnalizacji i komunikacji. Jednocześnie wrastał poziom białek związanych z proteasomem. W roślinach infekowanych kompleksem PSV-P z satRNA wzrastał poziom ekspresji białek związanych ze stresem oksydacyjnym i detoksykacją komórkową oraz malała ekspresja związanego z patogenezą białka PR2. Ponadto poziom genomowych RNA PSV-P był niższy a poziom fosforylacji wyższy niż w roślinach porażonych samym wirusem. Co istotne, efekt ten obserwowano również dla białek szlaków kwasu jasmonowego i kwasu salicylowego oraz białka UPF2 związanego z procesem degradacji mRNA niosących przedwczesny kodon STOP (nonsense mediated decay, NMD). Wyniki uzyskane w tej pracy potwierdzają hipotezę nr 1. Potwierdzają też rolę satelitarnego RNA jako elementu modulującego infekcję pomocniczego wirusa. Ponadto w pracy zaproponowano ciekawą hipotezę proponując, że satRNA obniża poziom genomowych RNA PSV P zwiększając poziom białka UPF2 w stosunku do roślin porażonych samym wirusem. Prowadzi to do degradacji wirusowego RNA w procesie NMD, który jest obok zjawiska interferencji RNA jednym z podstawowych mechanizmów obrony roślin przed wirusami. Hipoteza ta zdecydowanie jest warta dalszych badań.

W trzeciej publikacji Doktorantka uzupełniła wcześniej uzyskane funkcjonalne dane proteomiczne i fosfoproteomiczne o kontekst strukturalny, podejmując badania wpływu

wczesnego stadium infekcji roślin *N. benthamiana* samym wirusem PSV-P oraz w kompleksie z satRNA-P na kompartmenty komórkowe. Doktorantka przeprowadziła analizę wpływu obu wariantów infekcji na krótkie RNA (sRNA), transkryptom, proteom i fosfoproteom w kontekście ich lokalizacji komórkowej lub funkcjonalnych połączeń z poszczególnymi przedziałami komórkowymi. Wykazała, że infekcja PSV-P oraz PSV-P + satRNA powodowała różnicowe zmiany w poziomie ekspresji krótkich RNA i transkryptów mRNA oraz białek związanych z różnymi przedziałami komórkowymi, w tym rybosomami, chloroplastami, mitochondriami, jądrem i cytozolem, a najbardziej dotknięte procesy to fotosynteza, translacja, transkrypcja i splicing mRNA. Analiza transkryptów sRNA wykazała różnicową ekspresję miRNA i ta-siRNA, jednak nie znaleziono sekwencji docelowych dla tych sRNA w genomowych RNA PSV i satRNA. Analizując pozostałe transkrypty sRNA Doktorantka nie znalazła żadnego sRNA specyficznego dla satRNA. Zidentyfikowała jednak sRNA specyficzne dla każdego z trzech genomowych RNA PSV. Co więcej, dla tych sRNA docelowymi było wiele transkryptów mRNA związanych fosforylacją, a co za tym idzie z procesami sygnalizacji wewnątrzkomórkowej i odpowiedziami na bodźce.

Oryginalnym osiągnięciem Doktorantki, jest opisane w manuskrypcie czwartej publikacji uzupełnienie wcześniejszych danych na temat roli satRNA w cyklu życiowym PSV o jego wpływ na orientację i żerowanie *M. persicae*, co może w konsekwencji skutkować różnicą w nabywaniu i wydajności transmisji wirusa. Doktorantka założyła, że istnieją różnice w zachowaniu żerowania spowodowane obecnością satRNA, które mogą wpływać na tę wydajność. Doktorantka w badaniach zastosowała modelowy układ dwóch szczepów PSV, szczep G, naturalnie występujący bez satRNA oraz szczep P, któremu towarzyszy satRNA. Doktorantka potwierdziła wcześniejsze obserwacje, że satRNA w różny sposób wpływa na oba szczepy wirusa. W przypadku PSV-G obecność satRNA powoduje duży wzrost nasilenia objawów na roślinach, podczas gdy w przypadku PSV-P, satRNA łagodzi objawy i nasilenie infekcji. W obu przypadkach, w których doszło do zaostrzenia objawów chorobowych zmalała atrakcyjność zapachowa i żywieniowa roślin. Mszyce preferowały rośliny o łagodnych objawach nie tylko w porównaniu z roślinami o objawach ostrych ale również w stosunku do zdrowych roślin. Ten kapitalny wynik Doktorantka powtórzyła stosując inny cucumowirus – wirus mozaiki ogórka (CMV), którym infekowała rośliny *N. benthamiana* i pomidora stosując zdrowe rośliny jako kontrole oraz rośliny dodatkowo koinfekowane nienekrogennym satRNA (non-nc-satRNA) i nekrogennym satRNA (nc-satRNA). W tym przypadku nc-satRNA powodował nasilenie objawów i redukował atrakcyjność roślin dla mszyc, potwierdzając wyniki uzyskane dla PSV i satRNA. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę potwierdzają

kluczową rolę satRNA w biologii pomocniczego wirusa i wyjaśniają, przynajmniej częściowo rzadsze występowanie satRNA nasilających objawy wywoływane przez pomocniczy wirus w środowisku w porównaniu z tymi, które osłabiają objawy, pomimo ich negatywnego zazwyczaj wpływu na miano wirusa w roślinie. Doktorantka wykazała, że genotypy satRNA, które łagodzą objawy choroby i zmniejszają poziom akumulacji wirusa pomocniczego, jak w przypadku PSV-P + satRNA, są korzystne zarówno dla wirusa, jak i rośliny żywicielskiej, ponieważ rośliny stają się bardziej atrakcyjne dla mszyc. Wyniki tych badań potwierdzają, że w określonych warunkach satRNA stabilizują patogenezę, co zapewnia przetrwanie wirusa i rośliny żywicielskiej w ekosystemie. Natomiast w przypadkach, gdy satRNA prowadzi do pogorszenia objawów, zmniejsza prawdopodobieństwo przeniesienia wirusa na zdrowe rośliny. Na stronie 39 wkradł się tu drobny błąd literowy w ostatnim wierszu, zamiast „do”, jest „to”.

W piątej publikacji, będącej pracą przeglądową, Doktorantka wraz z promotorką dokonują podsumowania odkryć dokonanych w omówionych wyżej pracach. Ponadto stawiają fascynującą hipotezę, że satRNA to „game-changer” interakcji wirus-roślina-wektor, który w określonych warunkach (szczepu wirusa, sekwencji satRNA, gatunku rośliny-gospodarza) staje się swoistym buforem. Chroni zarówno wirus jak i roślinę osłabiając przebieg infekcji i zmniejszając koncentrację wirusa w roślinie, ale jednocześnie zwiększając efektywność transmisji pomocniczego wirusa. Ponadto roślina nie zamiera, przeżywa i stanowi źródło wirusa i satRNA przez dłuższy okres czasu, co dodatkowo zwiększa szanse na transmisję i przetrwanie tych symbiotycznych RNA w przyrodzie.

Kolejny rozdział dysertacji to **Podsumowanie**, w którym Doktorantka syntetycznie podsumowuje wyniki opisane w rozdziale poprzedzającym. Rozprawę kończą **Wnioski końcowe**, których Doktorantka sformułowała pięć i które potwierdzają postawione w rozprawie hipotezy.

Ocena końcowa

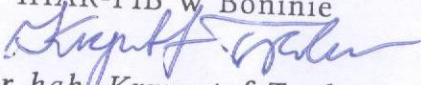
Przedstawiona do recenzji praca doktorska obejmuje bardzo obszerne i pracochłonne badania mające na celu zbadanie roli satelitarnego RNA w biologii pomocniczego wirusa PSV-P i w jego interakcjach z rośliną-gospodarzem na poziomie molekularnych. Stosując zaawansowane metody omiczne i klasyczne techniki biologii molekularnej i inżynierii genetycznej Doktorantka podeszła do tego zadania z pasją i z dużym rozmachem. Uzyskane przez nią wyniki są imponujące, znacząco powiększają wiedzę w obszarze biologii molekularnej wirusów roślinnych. Kapitalne są też opublikowane na razie w formie preprintu

badania nad rolą satelitarnego RNA w transmisji cucumowirusów przez mszyce.

Na podstawie pracy doktorskiej Doktorantki mogę stwierdzić, że prezentuje ona bardzo dobrą znajomość problematyki, którą się zajęła, wykazała ponadprzeciętną umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych, dysponuje niezbędnym ku temu bardzo bogatym warsztatem metodycznym i posiada umiejętności konieczne do planowania, analizowania, interpretowania i dyskutowania uzyskanych wyników. Dysertacja doktorska Pani mgr inż. Barbary Wrzesińskiej-Krupy wnosi istotny wkład w rozwój nauk rolniczych w obrębie dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo.

W mojej opinii, rozprawa doktorska mgr inż. Barbary Wrzesińskiej-Krupy pt. „Badanie molekularnych mechanizmów odpowiedzi *Nicotiana benthamiana* na infekcję wirusem karłowatości orzecha ziemnego (Peanut stunt virus, PSV) i jego satelitarnym RNA” spełnia wymagania ustawy o stopniach i tytule naukowym. W związku z powyższym, wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Ochrony Roślin - Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie mgr inż. Barbary Wrzesińskiej-Krupy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto wnioskuję o wyróżnienie rozprawy przez Radę Naukową IOR-PIB z uwagi na jej ponadprzeciętny charakter.

Z-ca Kierownika Oddziału
IHAR-PIB w Boninie


dr hab. Krzysztof Treder