

Warszawa, 18.01 2016 r.

Prof. dr hab. Agnieszka Mostowska
Zakład Anatomii i Cytologii Roślin
Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin
Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Edmunda Koziela
pt.: „Patogeneza organów wegetatywnych śliwy i roślin testowych porażonych wirusem
karłowatości śliwy (PDV)”**

Praca doktorska mgr Edmunda Koziela zatytułowana „Patogeneza organów wegetatywnych śliwy i roślin testowych porażonych wirusem karłowatości śliwy (PDV)” dotyczy charakterystyki zmian patogenicznych w roślinach zainfekowanych wirusem karłowatości śliwy oraz wyjaśnienia mechanizmu jego transportu lokalnego i systemicznego. Badania nad odpowiedzią rośliny na infekcję wirusów oraz ich transportem są jednym z głównych zagadnień, którymi zajmuje się grupa Pani Profesor Grażyny Garbaczewskiej, promotora rozprawy.

Praca doktorska składa się z dwóch części: manuskryptu (125 stron z 205 pozycjami literatury) i oddzielnego tomu dokumentacji fotograficznej wraz z opisami (108 tablic).

W krótkim Wstępie Autor wprowadza recenzenta w problematykę zagrożenia wirusem karłowatości śliwy wskazując jednocześnie na lukę w zakresie badań, którą niniejsza rozprawa powinna wypełnić. W drugiej, obszernej części rozprawy doktorskiej Autor przedstawia Przegląd literatury (36 stron). Autor charakteryzuje rodzinę *Bromoviridae*, w tym rodzaj *Ilarvirus*, do którego należy wirus PDV. Charakterystyka cząstek tego ikosahedralnego (dwudziestościennego) wirusa zawiera kompletny obraz zarówno struktury i organizacji genomu, funkcji białek kodowanych przez cząsteczki RNA wirusa, w tym białka transportowego (MP) i białka płaszczka (CP), jak i cyklu życiowego wirusa PDV. Autor, w sposób bardzo szczegółowy przedstawia również transport wirusów roślinnych, zarówno krótkodystansowy, jak i systemiczny oraz zaangażowanie w mechanizm transportu elementów cytoszkieletu; ta ostatnia część jest dość ogólna i nie dotyczy wyłącznie transportu wirusów, można byłoby pewnie w tak rozbudowanym Przeglądzie literatury ją pominąć lub skrócić. Ostatnia część Przeglądu literatury poświęcona jest wykorzystaniu programów komputerowych w badaniach filogenetycznych, modelowaniu i funkcji określonych białek. Ta część, bardzo interesująca, istotna z punktu widzenia badań własnych Autora uzasadnia wykorzystanie takich programów do analizy i modelowania struktury białek wirusowych. Reasumując, przedstawiony w rozprawie doktorskiej Przegląd literatury jest bogaty i bardzo kompetentnie zaprezentowany.

Celem badań Autora jest charakterystyka zmian patogenicznych roślin wywołanych infekcją wirusem PDV oraz zbadanie mechanizmu transportu lokalnego i systemicznego tego wirusa. Zrozumienie interakcji wirus-roślina, w przypadku wirusa karłowatości śliwy – jednego z najgroźniejszych patogenów drzew owocowych, jest nie lada wyzwaniem. Mimo, iż wirus ten został zidentyfikowany w latach 30-tych XX wieku nadal nie została poznana sekwencja zmian patologicznych w roślinach gospodarza, jak również mechanizmy transportu wirusa w roślinie. Nie zastosowano także dotychczas metod bioinformatycznych do przeprowadzenia analizy filogenetycznej dla ustalenia podobieństwa PDV do innych wirusów z rodziny *Bromoviridae*. Wszystkie te zagadnienia, niezwykle istotne w walce z wirusem

karłowatości śliwy stały się przedmiotem badań mgr Edmunda Koziela, przedstawionych w jego rozprawie doktorskiej.

Godna uznania jest metodyka pracy. Metody zastosowane w pracy stanowią różnorodny i bogaty wachlarz technik badawczych, Należy wśród nich wymienić techniki mikroskopowe i immunocytochemiczne, w tym immunofluorescencyjne, dla prześledzenia zmian anatomicznych i ultrastrukturalnych wywołanych infekcją wirusa oraz lokalizacji białek wirusa w tkankach i komórkach roślin. Dla sprawdzenia specyficzności przeciwciał i potwierdzenia obecności wirusa w roślinach źródłowych zastosowano DAS-ELISA-metodę podwójnego wiązania immunoenzymatycznego. Na szczególne podkreślenie zasługuje zastosowanie technik bioinformatycznych dla analiz filogenetycznych wybranych przedstawicieli *Bromoviridae*, przy użyciu sekwencji aminokwasowych białka transportowego (MP) oraz białka płaszczka (CP) wirusa, a także analizy struktury przestrzennej replikazy PDV (białka P1). Wszystkie te badania lub ich większość Autor przeprowadził na roślinach o różnym stopniu odporności na PDV: wrażliwych śliwie i tytoniu oraz na odpornej komosie ryżowej.

Druga część pracy a więc obszerny tom z 108 tablicami fotograficznymi i ich opisami zawiera w większości bardzo dobrą i trafną dokumentację wyników rozprawy doktorskiej. Komentarz dotyczący tej części zawarłam w Uwagach szczegółowych.

Za najważniejsze osiągnięcia recenzowanej rozprawy doktorskiej uważam:

- Przeprowadzenie metodami mikroskopowymi, immunocytochemicznymi i bioinformatycznymi, szczegółowej i wnikliwej analizy procesu infekcji roślin od prawdopodobnej integracji domeny transbłonowej wirusa z błonami komórek roślinnych poprzez zmiany deformacyjne i nekrotyczne komórek gospodarza, wykazując obecność cząstek wirusowych lub ich elementów w kolejnych organellach i strukturach komórkowych. Należy tu podkreślić, że analiza struktury trzeciorzędowej replikazy (białko P1) została dla wirusa PDV przeprowadzona po raz pierwszy wskazując na lokalizację tego białka w strukturach błonowych rośliny, a miejsce lokalizacji potwierdziły także analizy immunocytochemiczne.
- Wskazanie prawdopodobnego zaangażowania chloroplastów w replikowanie materiału genetycznego wirusa i składania jego cząstek, a także wakuoli w składanie i funkcjonowanie kompleksu replikacyjnego,
- Wyjaśnienie mechanizmu transportu cząstek wirusa PDV, zarówno krótkodystansowego, przez plazmodesmy z udziałem mikrotubul, jak i określenie roli elementów drewna i łyka w transporcie systemicznym/długodystansowym,
- Wykazanie podobieństwa w mechanizmie transportu wirusa PDV i AMV, a więc podobieństwa pomiędzy infekcją wirusową wywołaną tymi wirusami, dzięki zastosowanej analizie bioinformatycznej białek wirusowych, w szczególności homologii sekwencji białek MP i RBD,
- Wykazanie możliwej przyczyny odporności komosy ryżowej na infekcje PDV. Dzięki silnej nekrotyzacji komórek towarzyszących i odkładaniu się związków fenolowych w naczyniach powstał prawdopodobny mechanizm ograniczający rozprzestrzenianie się wirusa z wiązek przewodzących do dalszych tkanek.

Podsumowując, Autor pokazał, stosując nowoczesne metody biologii i bioinformatyki proces i mechanizmy infekcji tkanek roślinnych porażonych wirusem karłowatości śliwy (PDV), na tle podobieństw pomiędzy infekcjami innych przedstawicieli tej samej rodziny wirusów. Wyniki badań Autora stanowią poważny wkład w wyjaśnienie mechanizmów

infekcji roślin wirusami z rodziny *Bromoviridae*, a co za tym idzie potencjalnej walki z tymi groźnymi patogenami.

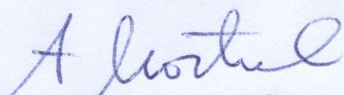
Praca jest napisana bardzo jasno, zwięźle, dojrzałym i przystępnym językiem; bardzo dobrze się ją czyta. Tekst pracy jest zrozumiały i przejrzysty; zdarzają się tylko nieliczne błędy literowe lub niezręczności językowe zaznaczone na marginesie recenzowanej pracy. Nie znalazłam błędów w cytowaniu pozycji literaturowych.

Uwagi szczegółowe:

1. Jak wspomniałam wcześniej, część dotycząca roli cytoskieletu w transporcie zamieszczoną w Przeglądzie literatury możnaby pominąć lub skrócić, ponieważ dotyczy ona nie tylko transportu wirusów.
2. Schematy ilustrujące Przegląd literatury mają objaśnienia w języku angielskim, np. w Figs. 4, 5, 7. Skoro Autor opisał te rysunki jako zmodyfikowane, to mógłby zrobić także własne, polskie objaśnienia.
3. Nie jest całkiem dla mnie jasne, czym Autor kierował się wybierając do niektórych analiz materiał z dwóch, a nie wszystkich trzech gatunków roślin, np. do immunofluorescencji lokalizacji CP i białka P1 wybrał tytoń i komosę, ale nie śliwę (rozdział 4.9, str 55 i 4.10 str 56), natomiast do immunolokalizacji tych samych białek materiał badany był ze wszystkich trzech gatunków (rozdział 4.11, str. 57).
4. Wiele fotografii z analizy ultrastruktury jest bardzo dobrych, ostrych, ale zdarzają się także niewyraźne np. Tabl. 10A, 21 A, czy Tabl. 45D, Tabl. 48B, Tabl. 65 B, które pewnie możnaby w tym bogactwie zdjęć pominąć bez szkody dla meritum pracy. Nie mam zastrzeżeń do jakości zdjęć z badań wykonanych metodami immunofluorescencyjnymi i immunocytochemicznymi.
5. Wielkość cząstek wirusa PDV jest mała, ok. 25- 30 nm. Czy Autor jest pewien, że ziarnistości oglądane i opisywane jako VP to są istotnie cząstki wirusa, a nie np. strąty w wakuoli Tabl. 16B, 17B, 18B lub rybosomy w cytoplazmie, o podobnej wielkości, np. Tabl. 19B, C, Tabl. 22B, C, Tabl. 55B, D, Tabl. 57A. Na bardzo dobrej jakości zdjęciu z Tabl. 22A czy na zdjęciu z Tabl. 26A,B na pewno wśród cząstek wirusowych są także rybosomy, tylko które są które? Spodziewam się, że Autor doszedł do dużej wprawy w rozróżnianiu typów ziarnistości o podobnej wielkości.

W sumie pracę mgr Edmunda Koziela oceniam bardzo pozytywnie. Uważam, że Doktorant podjął ważny temat badawczy, a recenzowana rozprawa doktorska wnosi wiele nowych, bardzo dobrze udokumentowanych danych do poznania mechanizmów infekcji roślin porażonych wirusem karłowatości śliwy (PDV) Praca doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawie doktorskiej zgodnie z Ustawą o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Stawiam więc wniosek do Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW o dopuszczenie mgr Edmunda Koziela do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na rangę uzyskanych wyników stawiam wniosek o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.


Prof. dr hab. Agnieszka Mostowska