



Dr hab. Beata Hasiów-Jaroszewska
Instytut Ochrony Roślin-PIB
Zakład Wirusologii i Bakteriologii
ul. Wł. Węgorka 20
60-318 Poznań

Poznań, 14.06.2019

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Grupy-Urbańskiej pt.
„Interakcje między izolatami wirusa Y ziemniaka (*Potato virus Y*, PVY) i wirusa M
ziemniaka (*Potato virus M*, PVM) w infekcjach mieszanych”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Grupy-Urbańskiej została wykonana w Zakładzie Genetyki i Materiałów Wyjściowych Ziemniaka, Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-Państwowego Instytutu Badawczego, Oddział w Młochowie pod kierunkiem Pana dr. hab. Jerzego Syllera. W rozprawie podjęto się scharakteryzowania oddziaływań zachodzących między różnymi genetycznie izolatami wirusa Y ziemniaka (*Potato virus Y*, PVY) w infekcjach mieszanych w roślinach ziemniaka i tytoniu. Ponadto, oceniano zdolność mszycy brzoskwiowo-ziemniaczanej (*Myzus persicae*) do jednoczesnego przenoszenia dwóch izolatów PVY. Celem badań była również analiza interakcji między różnymi izolatami wirusa M ziemniaka (*Potato virus M*, PVM) w roślinach gatunku bielun surmikwiat (*Datura metel* L).

Wzajemne oddziaływania wirusów, które nie są ze sobą spokrewnione mają zwykle charakter synergistyczny lub obojętny. W przypadku synergizmu jeden wirus wspomaga replikację drugiego co często wiąże się ze zwiększeniem akumulacji cząstek wirusa w roślinie. Efektem może być zaostrzenie objawów chorobowych w porównaniu do symptomów na roślinach porażonych tymi wirusami oddzielnie. Przeciwnieństwem są oddziaływania o charakterze antagonistycznym, które zachodzą zwykle pomiędzy blisko spokrewnionymi wirusami lub w obrębie populacji danego wirusa między jego izolatami. Oddziaływania antagonistyczne są wykorzystane w praktyce rolniczej w ramach ochrony krzyżowej (ang. *cross-protection*). Zjawisko to polega na celowym infekowaniu roślin łagodnym izolatem wirusa (izolat ochronny) celem ich ochrony przed bardziej agresywnymi wariantami (izolaty

konkurencyjne). Skuteczność ochrony krzyżowej jest uzależniona od wielu czynników, a jednym z najważniejszych jest dobór odpowiedniego izolatu ochronnego. Podjęcie tematyki wzajemnych oddziaływań pomiędzy wirusami uważam za niezwykle ważne zwłaszcza w kontekście pojawiających się na rynku produktów ochrony roślin przed wirusami, w których wykorzystywane jest zjawisko ochrony krzyżowej. O ważności tego zagadnienia świadczy również przyznanie na te badania finansowania w ramach projektu badawczego OPUS z Narodowego Centrum Nauki (kierownik dr hab. Jerzy Syller).

Rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Grupy-Urbańskiej stanowi kompilacja pięciu artykułów opublikowanych w latach 2014-2018, z czego dwa to prace przeglądowe (artykuł I i II):

- I. **Grupa A.**, Syller J. (2015). Mieszane infekcje wirusowe roślin: współdziałanie czy rywalizacja terytorialna między wirusami? *Kosmos* 64 (1): 47–56
- II. Syller J., **Grupa A.** (2016). Antagonistic within-host interactions between plant viruses: molecular basis and impact on viral and host fitness. *Molecular Plant Pathology* 17 (5): 769-782.
- III. Syller J., **Grupa A.** (2014). The effects of co-infection by different *Potato virus Y* (PVY) isolates on virus concentration in solanaceous hosts and efficiency of transmission. *Plant Pathology* 63 (2): 466-475
- IV. **Grupa A.**, Otulak-Kozieł K, Syller J. (2018). Serological, molecular and immunofluorescent evidence for interference competition between isolates of *Potato virus Y*. *Plant Pathology* 67 (9): 1997-2012
- V. **Grupa A.**, Syller J. (2016). Cross-protection between a naturally occurring mild isolate of *Potato virus M* (PVM) and a more virulent isolate in *Datura metel* plants. *Journal of Phytopathology* 164 (1): 69-73

Sumaryczny współczynnik wpływu prac składających się na rozprawę doktorską mgr inż. Anny Grupy-Urbańskiej wynosi 10,552, a w trzech z nich Doktorantka jest pierwszym autorem. Cztery artykuły zostały opublikowane w czasopiśmie o szerokim zasięgu międzynarodowym. Do cyklu publikacji składających się na rozprawę doktorską dołączono również Streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim, krótki Przegląd Literatury dotyczący różnego typu oddziaływań pomiędzy wirusami, Materiał i Metody, w którym opisano głównie metodykę stosowaną w publikacji IV, następnie opis Celu i Wyników uzyskanych w ramach publikacji badawczych (III, IV i V), ich Podsumowanie i Wnioski oraz Bibliografię. Ponadto do dysertacji załączono oświadczenia współautorów, które wskazują na dominującą rolę mgr inż. Anny Grupy-Urbańskiej w przeprowadzeniu opisanych badań i analiz. Rozprawę Pani mgr inż. Anny Grupy-Urbańskiej oceniam wysoko. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wnoszą wiele istotnych informacji na temat interakcji pomiędzy izolatami PVY i PVM w infekcjach

mieszanych oraz czynnikach wpływających na charakter tych oddziaływań. W pracach przedstawionych w rozprawie wykazano, że zarówno pomiędzy genetycznie różnymi izolatami PVY, jak i PVM zachodzą oddziaływania o charakterze antagonistycznym. W roślinach ziemniaka i tytoniu zainfekowanych równocześnie bądź w odstępie 3 lub 7 dni dwoma izolatami PVY jeden izolat ograniczał namnażanie i akumulację drugiego izolatu, przy czym stwierdzono dominację izolatów NTN nad izolatami o serotypie O. Wykazano ponadto, że pojedyncze mszyce gatunku *Myzus persicae* były zdolne do równoczesnego nabywania i przenoszenia dwóch izolatów PVY. Jest to niezwykle istotne z ewolucyjnego punktu widzenia może bowiem zwiększać możliwość zachodzenia rekombinacji i tym samym powstawania nowych wariantów genetycznych oraz rozprzestrzeniania się wirusa w uprawach ziemniaka, tytoniu lub innych roślin z rodziny psiankowatych. Przeprowadzone badania wykazały również występowanie antagonistycznych oddziaływań pomiędzy izolatami PVM. Po raz pierwszy w świecie wykazano, że porażenie roślin *Datura metel* łagodnym izolatem całkowicie lub częściowo chroniło rośliny przed infekcją bardziej wirulentnym izolatem tego wirusa. Uzyskane wyniki wskazują na potencjalną możliwość stosowania niektórych badanych izolatów w ramach ochrony krzyżowej, zatem rozprawa, poza aspektem poznawczym, ma znaczenie praktyczne. W badaniach Doktorantka wykazała się znajomością oraz umiejętnością wykorzystania różnych metod biologicznych, serologicznych i molekularnych do realizacji obranych celów. Bardzo ciekawą pozycją w rozprawie jest również praca przeglądowa (publikacja II) opublikowana w renomowanym czasopiśmie *Molecular Plant Pathology*. W pracy tej, w sposób bardzo jasny i przejrzysty, przedstawiono informacje z literatury światowej (oraz z badań własnych) dotyczące różnego typu oddziaływań pomiędzy wirusami, ich mechanizmów, wpływu na wirusa i gospodarza a także możliwości ich potencjalnego wykorzystywania w ochronie roślin. Druga z prac przeglądowych została opublikowana w czasopiśmie *Kosmos* i stanowi podsumowanie danych uzyskanych w ramach tej tematyki w języku polskim. W mojej ocenie nie było konieczności włączania tej publikacji do rozprawy.

Podczas analizy dysertacji Pani mgr inż. Anny Grupy-Urbańskiej nasunęło mi się kilka pytań i wątpliwości, i prosiłabym Doktorantkę o ich wyjaśnienie w trakcie publicznej obrony:

1. Nie jest dla mnie zrozumiałe dlaczego Doktorantka, w załączonym do cyklu publikacji opisie Materiału i Metod, zdecydowała się na ponowne omówienie metodyki badań, którą stosowała w publikacjach III, IV i V. W mojej ocenie nie było takiej potrzeby. Jedne z metod są opisane bardziej szczegółowo inne zdecydowanie mniej, poza tym w rozdziale pojawiają się nieścisłości: Doktorantka podaje, że przeprowadziła izolację metodą immunocapture RT-PCR (IC-RT-PCR) a następnie syntezę cDNA (str. 16 dysertacji

i publikacja IV). IC-RT-PCR stanowi połączenie metody serologicznej z RT-PCR. W pierwszym etapie ma miejsce „wylapywanie” wirionów występujących w soku roślinnym przez specyficzne przeciwciała. W drugim etapie przeprowadzana jest właściwa reakcja amplifikacji materiału genetycznego wirusa (RT-PCR). Jaki więc rodzaj izolacji Doktorantka ma na myśli i w jaki sposób przeprowadziła syntezę cDNA?

2. Kolejną moją wątpliwość budzi sporządzenie krzywych standardowych w reakcji RT-qPCR z użyciem serii rozcieńczeń cDNA (publikacja IV i str. 17 rozprawy). Powszechną praktyką w tego typu analizach jest stosowanie transkryptów RNA, co pozwala na oszacowanie ilości kopii wirusa w badanych próbkach. W przyszłości radziłabym taki sposób postępowania w przypadku reakcji RT-qPCR, zwłaszcza jeśli celem jest dokładne zbadanie poziomu akumulacji RNA wirusa w roślinach.

3. W jaki sposób dokonano wyboru modelu substytucji nukleotydów do przeprowadzania analiz filogenetycznych (publikacja IV i str. 17 rozprawy)? Czy został on skalkulowany w programie MEGA7?

4. Kolejna moja uwaga dotyczy niektórych sformułowań, które pojawiają się w rozprawie, a które w mojej ocenie nie są adekwatne bądź nie oddają zamierzonego sensu. W przypadku wirusów trudno bowiem mówić aby „jeden hamował czynności życiowe drugiego” czy o ich „kondycji” (ang. *viral fitness*) (publikacja I i str. 2, 24 rozprawy). Niezbyt fortunne wydaje mi się również zaproponowane przez Doktorantkę określenie „ekskluzja nadkażenia” jako polski odpowiednik terminu „*superinfection exclusion*” (publikacja I i str. 6, 7 rozprawy). W tej samej pracy przeglądowej Doktorantka przytacza inne angielskie określenie „*mutual exclusion*”, które tłumaczy jako „wzajemne wykluczenie”, należałoby więc się zastanowić czy i w przypadku „*superinfection exclusion*” nie użyć słowa „wykluczenie” zamiast „ekskluzja”. Jest też pewną niekonsekwencją tłumaczenie wybranych terminów a innych nie np. *bootstrap*, *immunocapture* (str. 16, 17 rozprawy). Pozostawiam to jednak do szerszej dyskusji.

Wskazane w recenzji uwagi i komentarze nie wpływają na pozytywną ocenę rozprawy, która wnosi wiele cennych informacji dotyczących wzajemnych oddziaływań między izolatami PVY i PVM do literatury światowej. Obok aspektu poznawczego, przedstawione w rozprawie badania mają również znaczenie użytkowe i otwierają drogę do dalszych, pogłębionych badań nad potencjalnym zastosowaniem wybranych izolatów tych wirusów np. w ochronie krzyżowej. W styczniu 2017 roku Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi zarejestrowało produkt PMV®-01 jako środek ochrony roślin, w którym wykorzystano łagodny izolat wirusa mozaiki pepino do ochrony roślin pomidora przed bardziej agresywnymi izolatami tego wirusa.

W tym kontekście chciałabym zapytać Doktorantkę czy posiada wiedzę (czy też może dopiero planuje badania) o charakterze oddziaływań między izolatami PVY w innych roślinach gospodarczo-ważnych (np. pomidor?). Czy w świetle uzyskanych w ramach rozprawy wyników Doktorantka widzi możliwość opracowania podobnych produktów ochrony roślin z wykorzystaniem izolatów PVY lub PVM? Jaką Doktorantka widzi trudności w opracowywaniu tego typu produktów i czy według Niej są one skuteczną formą ochrony roślin przed wirusami?

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr inż. Anny Grupy-Urbańskiej spełnia kryteria określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 nr 65, poz. 595 z póź. zm.) stawiane rozprawom doktorskim. Z powyższych względów, zwracam się zatem do Rady Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowego Instytutu Badawczego w Radzikowie o dopuszczenie mgr inż. Anny Grupy-Urbańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie, mając na uwadze znaczenie przeprowadzonych badań dla rozwoju wirusologii roślin, ich wartość poznawczą i praktyczną, zwracam się do Rady IHAR-PIB w Radzikowie o wyróżnienie ocenianej rozprawy stosowną nagrodą.

Haniów - Jaroszewna