

Prof. dr hab. Józef J. Bujarski
Northern Illinois University (DeKalb, IL, USA)
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN (Poznań)

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Edmunda Koziela

pt.: „ Patogeneza organów wegetatywnych śliwy i roślin testowych porażonych wirusem karłowatości śliwy (PDV)”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska jest poświęcona analizie zmian patogenicznych w roślinach gospodarza zakażonych wirusem karłowatości śliwy (PDV). Praca została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Grażyny Garbaczewskiej, która od wielu lat zajmuje się badaniami nad przebiegiem procesów infekcji wirusowych na poziomie subkomórkowym w tkankach gospodarczo ważnych roślin. Tematem badań mgr Edmunda Koziela była analiza porównawcza zmian na poziomie tkankowym i komórkowym wywołanych przez PDV w trzech roślinach gospodarza. PDV jest jednym z najgroźniejszych patogenów drzew owocowych, szeroko rozpowszechnionym na świecie, porażającym ponad sto gatunków rodzaju *Prunus*. Wybór tematu jest uzasadniony, gdyż charakterystyka przebiegu infekcji PDV przyczynia się do zrozumienia istoty patogeniczności tego wirusa.

Pod względem formalnym rozprawa spełnia wymagane warunki dla prac doktorskich w zakresie układu rozdziałów w części I, dających przegląd literatury, i opisujących materiały i metody, wyniki, oraz dyskusję i spis cytowanej literatury ale też w części II gdzie na 108 tablicach fotograficznych udokumentowano wyniki i konkluzje.

Przegląd literatury jest bardzo obszernym opracowaniem świadczącym o dogłębnym zapoznaniu się autora z aktualnym stanem badań. Łącznie rozdziały: „Wstęp” i „Przegląd literatury” stanowią 44 strony ze 107 stron tekstu. W tych rozdziałach autor w kolejności charakteryzuje PDV (struktura wirusa, organizacja genomu, funkcje kodowanych białek, cykl życiowy PDV, reakcje i ochrona roślin porażonych), opisuje znane mechanizmy transportu wirusów roślinnych (transport na krótki dystans, transport na dalsze odległości), molekularne odpowiedzi roślin na infekcję wirusową, rolę cytoszkieletu i plazmodesm w transporcie komórkowym

(mikrotubule, mikrofilamenty, transport przez plazmodesmy) oraz stosowanie programów komputerowych w analizie filogenetycznej i w modelowaniu strukturalnym. Wszystkie te zagadnienia są potraktowane wyczerpująco w oparciu o dostępną literaturę, i ukazują właściwie tło względem którego autor prowadził swoje badania, uwzględniając również wcześniejsze prace wykonane w Katedrze Botaniki SGGW.

Cele pracy sformułowane przez doktoranta były następujące:

1. Lokalizacja zmian na poziomie tkankowym i komórkowym wywołanych przez wirus karłowatości śliwy (ang. *Prune dwarf virus*, PDV) na wybranych roślinach w zależności od stopnia odporności i czasu infekcji.
2. Analiza filogenetyczna MP, CP pod kątem podobieństwa do znanych *Bromoviridae*.
3. Określenie struktury replikazy (białka P1) zaangażowanej w tworzenie kompleksu replikacyjnego PDV.
4. Immunolokalizacja białka płaszczka wirusa PDV (CP-PDV) oraz białka P1 (P1-PDV) w komórkach porażonych.
5. Identyfikacja mechanizmu transportu lokalnego i systemicznego PDV w oparciu o analizy bioinformatyczne i mikroskopowe.

Oceniając te części rozprawy doktoranta chciałbym podkreślić, że cele pracy są zakrojone szeroko, lecz adekwatnie do myśli przewodniej jaką jest charakterystyka na kilku poziomach elementów cyklu życiowego PDV istotnych dla patogeniczności tego wirusa. Materiały i Metody opisano właściwie z Tabelą sumującą dane sekwencji aminokwasowych białek różnych szczepów PDV, podaniem źródeł materiału roślinnego, warunków infekcji i hodowli, ekstrakcji i oczyszczania PDV, jak również metod komputerowych do analizy porównawczej sekwencji, struktury białek, oraz metod immunochemicznych i mikroskopii elektronowej. Opis stosowanych metod jest zadowalający i wystarczający do powtórzenia doświadczeń w każdym odpowiednio wyspecjalizowanym laboratorium.

W kolejnym rozdziale rozprawy pt.: „Wyniki” doktorant opisuje rezultaty badań w zakresie trzech podstawowych zagadnień: (i) analiza porównawcza białek PDV, (ii) modelowanie struktury białka replikazy PDV oraz (iii) analiza zmian morfologicznych i ultrastrukturalnych tkanek roślin zarażonych PDV. Odnośnie pierwszego zagadnienia doktorant wykazał, że zarówno białko transportowe (MP) jak i białko płaszczka (CP) kwalifikują szczepy PDV jako osobną podgrupę w obrębie *Bromoviridae*. W punkcie (ii) autor pokazał model struktury trzeciorzędowej białka P1, potwierdzając dwufunkcyjność tego białka, tak

charakterystyczną dla *Bromoviridae*. I wreszcie najdłuższy punkt (iii) pokazuje, że zmiany morfologiczne i anatomiczne w komórkach śliwy, tytoniu i komosy ryżowej porażonych PDV są gatunkowo specyficzne i mogą być użyte w diagnostyce infekcji PDV. Natomiast w punkcie (iii) obserwowano zmiany ultrastrukturalne z użyciem mikroskopii immunofluorescencyjnej oraz mikroskopii elektronowej (immuno-złoto koloidalne) i one potwierdzają z jednej strony różnego rodzaju anomalie i uszkodzenia wewnątrzkomórkowe ale też dokumentują obecność cząstek wirusowych oraz indywidualnych białek PDV w organellach, i to nie tylko cytoplazmatycznych ale też w jądrze komórkowym. Tym samym sugerują udział jądra w procesie namnażania wirusa wewnątrz komórki. Szczególnie badania w części trzeciej stanowią główne osiągnięcia doktoranta, uzupełniając naszą wiedzę o rozmieszczeniu i funkcjonowaniu bromowirusów w obrębie struktur subkomórkowych. Dla udokumentowania wyników badań przedstawiono bardzo obszerną dokumentację fotograficzną, w formie kilkudziesięciu wysokiej jakości tablic (w części II).

W szóstym rozdziale (Dyskusja) doktorant interpretuje wyniki swoich badań. Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych pokazuje wysokie podobieństwa do białek transportowych oraz białek płaszcza innych *Bromoviridae*, czym potwierdza nie tylko przynależność PDV do tej rodziny wirusów czy łączy rozliczne szczepy PDV w określone podgrupy ale też potwierdza ich funkcje oraz sugeruje mechanizm przemieszczania się PDV przez plazmodesmy w formie cząstek wirusowych. Aczkolwiek wnioski są zasadne i nowatorskie, dalsze badania eksperymentalne są niezbędne dla potwierdzenia hipotez autora. Podobnie, przewidywanie struktury przestrzennej białka P1 PDV za pomocą serwera AIDA potwierdza dwu-domenowość tego białka, rozpoznaną wcześniej u innych bromowirusów i pozwala autorowi wnioskować o położeniu domeny transbłonowej oraz miejsca kotwiczenia się P1 bezpośrednio w strukturach błonowych. Bardzo to właściwe wnioskowanie pokazujące znajomość u doktoranta metod bioinformatycznych. I wreszcie po trzecie, analiza zmian morfologicznych, anatomicznych i ultrastrukturalnych pokazują zarówno odmienność reakcji na infekcję PDV w trzech różnych gospodarzach ale też ich elementy wspólne, w różnych typach tkanek jak i na poziomie subkomórkowym w różnych organellach. Autor pokazuje zależność lokowania się kompleksu replikacyjnego RNA od gospodarza, czyli odróżnicowanie się pęcherzyków od ER u śliwy lecz raczej od tonoplastu u komosy i tytoniu. Nie jest pewne (aczkolwiek prawdopodobne) czy pęcherzyki kompleksu replikacyjnego różnicują się też z błon chloroplastowych czy mitochondrialnych. Ciekawe są konkluzje na temat sposobów transportu PDV w

trzech roślinach gospodarza. Jednak autor nie odniósł się do badań nad innymi bromowirusami i nie próbował bardziej jednoznacznie lokalizować miejsc replikacji RNA wirusowego, tzw sferul czyli odrębnych pęcherzykowych struktur błonowych mieszczących kompleks replikujący RNA. Poza tym, ogólnie dyskusja w punkcie trzecim (strony od 88 do 105) jest trochę za długa, stanowi powtórzenie opisu wyników i główne wnioski są trudne do uchwycenia. Aczkolwiek trzeba przyznać, że doktorant prowadzi dyskusję elokwentnie i w oparciu o aktualne dane literaturowe u pokrewnych wirusów. Spis literatury obejmuje pokaźną liczbę ponad 200 cytowanych pozycji.

Końcowe podsumowanie wyników (str. 106-107) bardzo pomaga w zrozumieniu i ogarnięciu całości. Autor wykazał podobieństwa białka transportowego i białka płaszczka PDV do dobrze scharakteryzowanych wirusów, odpowiednio AMV i BMV, i tym samym ukierunkowuje właściwie dalsze badania nad transportem i składaniem cząstek PDV. W białku P1 zidentyfikował dwie prawdopodobne domeny: wiązania do P2 oraz transbłonową. Z kolei badania ultrastrukturalne wskazują na udział chloroplastów i mitochondriów w procesie replikacji RNA i składaniu wirionów ale też nie jest wykluczone, że składanie kompleksu replikacyjnego może zachodzić w błonach tonoplastu i wakuoli. Natomiast kolokalizacja białka płaszczka i replikazy sugeruje udział białka płaszczka w reakcjach replikacji RNA wirusowego. Transport międzykomórkowy odbywa się poprzez plazmodesmy prawdopodobnie wzdłuż mikrotubul a transport systemiczny zapewniają prawdopodobnie zarówno sity (łyko) jak i *tracheae* (drewno).

Jak widzimy, doktorant umiejętnie wykorzystał zarówno bioinformatykę jak i metody cytologiczne i immunocytochemiczne na poziomie mikroskopowym do kompleksowej charakterystyki szeregu ważnych etapów cyklu życiowego wirusa PDV. Co prawda szereg wniosków autora należy traktować jako prawdopodobne sugestie, które wymagają dalszego potwierdzenia eksperymentalnego. Jednak zebrane przez autora wyniki dobrze posłużą dalszemu ukierunkowaniu badań nad PDV.

Jeśli chodzi o pisownię cytowań, sugerowałbym aby zdefiniować skrót „i wsp.” jako „i współautorzy” (lecz nie jako „i współpracownicy”) gdyż mogą być współautorzy którzy nie są współpracownikami. Poza tym w tekście zauważyłem wiele niezręczności językowych (stylistycznych) oraz pomyłek literowych (literówek) oraz kilka błędów ortograficznych. Zdarzyło się też autorowi użycie wyrazów pochodzących z języka angielskiego, które w miarę możliwości należałoby zastąpić polskimi odpowiednikami. Nie będę tutaj szczegółowo wymieniał

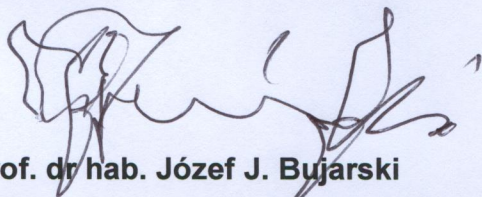
wszystkich uchybień edytorskich i językowych. Starłem się te i inne nieścisłości zaznaczyć w wersji elektronicznej i odesłałem je doktorantowi drogą elektroniczną.

W podsumowaniu recenzji chciałbym podkreślić, że mgr Edmund Koziel opanował zadowalająco warsztat badawczy z zakresu wirusologii roślin i dokonał wielu ważnych obserwacji na temat cyklu replikacyjnego i patogenezы PDV, ekonomicznie ważnego wirusa drzew owocowych. Chociaż autor w tekście swojej pracy nie ustrzegł się błędów głównie językowych i redakcyjnych, i one wymagają poprawienia przed wysłaniem pracy do druku, to jednak nie wpływają one na wysoką ocenę znaczenia całokształtu pracy. Praca mgr Koziela zasługuje na wyróżnienie.

Wniosek

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa mgr Edmunda Koziela spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i odpowiada warunkom określonym w Ustawie o tytułach i stopniach naukowych.

Wnoszę do Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW o dopuszczenie mgr Edmunda Koziela do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Józef J. Bujarski
Northern Illinois University (DeKalb, IL, USA)
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN (Poznań)