



Warszawa, 24.07.2019

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Martyny Krejmer-Rąbalskiej zatytułowanej**  
**"Metody detekcji oraz charakterystyka genetyczna bakulowirusów infekujących gąsienice**  
**żerujące na drzewach o znaczeniu gospodarczym"**

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo z dnia 20 maja 2019 r. (L.dz. M000/43/2/2019) zgodnie z uchwałą Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Martyny Krejmer-Rąbalskiej została przygotowana w kierowanym przez Pana prof. dr. hab. Bogusława Szewczyka Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Projekt doktorski był realizowany we współpracy z Zakładem Ochrony Lasu Instytutu Badawczego Leśnictwa (IBL) w Sękocinie, którego Kierownik, Pani dr hab. Iwona Skrzecz, prof. IBL jest Kopromotorem rozprawy.

Tematyka rozprawy dotyczy wirusów infekujących owady, należących do rodziny *Baculoviridae*. Wyniki realizacji projektu doktorskiego mgr Krejmer-Rąbalskiej stanowią istotny wkład w badania nad genetyczną różnorodnością oraz ewolucją przedstawicieli *Baculoviridae*. Obok wartości naukowej badania mają duży potencjał aplikacyjny, ponieważ bakulowirusy, jako naturalne patogeny owadów znalazły zastosowanie jako biopestycydy. Obiektem zainteresowania Doktorantki były wirusy infekujące żerujące na uprawach leśnych gąsienice motyli z rzędu Lepidoptera, w tym jednego z najgroźniejszych szkodników - brudnicę nieparkę. Masowe pojawy tych owadów są przyczyną zamierania drzew na dużych obszarach, co powoduje poważne szkody ekonomiczne i środowiskowe. Ze względu na rolę jaką ekosystemy leśne pełnią w powstrzymaniu dalszych zmian klimatycznych i łagodzeniu ich skutków, kwestia ochrony lasów jest niezwykle ważnym i aktualnym zagadnieniem. Równie aktualna jest potrzeba ograniczenia stosowania chemicznych pestycydów i zastąpienia ich przez biologiczne środki ochrony roślin. Mając powyższe na uwadze należy wysoko ocenić trafność wyboru tematyki badawczej ocenianej rozprawy.

Wyniki będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w pięciu pracach oryginalnych. Cztery z tych prac ukazały się w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports, a jedna w czasopiśmie nie znajdującym się w tej bazie (*Genome Announcements*). Oznacza to, że zostały już ocenione przez recenzentów i spełniły wymogi redakcyjne. Pięcioletnie współczynniki oddziaływania czasopism (IF<sub>2018</sub>) oraz liczba punktów na liście A MNiSW wynoszą odpowiednio, dla *International Journal of Molecular Sciences* - 4.331/30, *BMC Genomics* - 4.142/40, *Viruses-Basel* - 3.916/30, *Journal of Invertebrate Pathology* - 2.535/40. Mgr Martyna Krejmer-Rąbalska jest pierwszą autorką czterech publikacji oraz w przypadku piątego artykułu figuruje jako drugi autor, ale z zaznaczeniem jednakowego udziału z pierwszym autorem. Kandydatka jest również autorem korespondującym w tej publikacji. Nasuwa się więc pytanie

dlaczego rozprawa została przygotowana w formie monografii wykorzystującej materiał obecny w publikacjach, a nie jako zbiór publikacji.

Oceniana rozprawa jest napisana w języku polskim, zawiera 194 strony z 67 rycinami i 27 tabelami (w tym 7 w Aneksie). Tytuł odzwierciedla jej zawartość. Rozprawa ma poprawny układ i strukturę, na którą składają się Streszczenia w języku polskim i angielskim, Wprowadzenie, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja kończąca się zwięzłym podsumowaniem, Bibliografia oraz Aneks. Autorka zamieściła również wykaz używanych skrótów. W streszczeniach w języku polskim i angielskim Autorka przedstawiła w zwięzły sposób cele badawcze, wykorzystywane techniki oraz podsumowała wyniki przeprowadzonej analizy pełnych genomów alfabakulowirusów oraz wyniki walidacji opracowanych metod detekcji i różnicowania betabakulowirusów. Obszerne Wprowadzenie Autorka rozpoczęła od krótkiego przedstawienia historii odkrycia bakulowirusów, ich nazewnictwa oraz systematyki rodziny *Baculoviridae*. Następnie szczegółowo opisała morfologię, genom, drogi transmisji, przebieg cyklu życiowego na przykładzie modelowego przedstawiciela rodziny *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* – *AcMNPV* oraz proces replikacji wirusowego DNA. Kolejną część Wprowadzenia Autorka rozpoczęła od opisu groźnych dla ludzi i środowiska konsekwencji stosowania chemicznych pestycydów, co wskazuje na konieczność ich zastąpienia przez użycie selektywnych i bezpiecznych naturalnych środków ochrony roślin, w szczególności opartych na bakulowirusach. Następnie omówiła przykłady sukcesów związanych ze stosowaniem dostępnych komercyjnie preparatów bakulowirusów jako insektycydów. Podkreśliła potrzebę poszukiwania nowych gatunków/izolatów, które będą mogły być wykorzystane do zwalczania szkodników oraz opracowania szybkich metod przesiewowych dla detekcji bakulowirusów w próbach środowiskowych. Autorka poza zaletami bakulowirusów zwracała uwagę na istotną wadę, jaką jest ich powolne działanie, będące jednym z czynników powodujących ograniczone zainteresowanie ich użyciem. W tym miejscu, lub w Dyskusji, mogłaby znaleźć się informacja dotycząca działań ukierunkowanych na otrzymanie rekombinantów o przyspieszonym działaniu. Chciałabym poznać zdanie Doktorantki na temat możliwości wykorzystania tych modyfikowanych genetycznie bakulowirusów jako insektycydów. Ostatnią część rozdziału stanowi opis metod detekcji bakulowirusów w próbach środowiskowych lub w hodowlach gąsienic. Wymieniając klasyczne metody mikroskopowe i immunologiczne Autorka skupiła uwagę na przedstawieniu nowoczesnych metod opartych na wykorzystaniu materiału genetycznego ze szczególnym uwzględnieniem stosowanej w niniejszej pracy technologii sekwencjonowania nowej generacji (ang. Next Generation Sequencing - NGS) firmy Illumina, wielotemperaturowego polimorfizmu konformacyjnego jednoniciowego DNA (ang. multitemperature single stranded DNA conformational polymorphism, MSSCP) i reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem barwnika SYRB Green. Zawarty na 41 stronach rozdział ilustrowany 16 starannie opracowanymi rycinami oraz trzema tabelami stanowi przekonujące uzasadnienie dla sformułowania celu pracy, którym było "wykorzystanie nowoczesnych technik do detekcji i charakterystyki genetycznej bakulowirusów wyizolowanych z gąsienic szkodników ważnych gospodarczo drzew oraz opracowanie metody umożliwiającej detekcję oraz różnicowanie gatunków bakulowirusów z próbek środowiskowych".

Kolejne rozdziały zawierają przejrzyste opracowane opisy Materiałów i Metod stosowanych do realizacji zaplanowanych celów. W pewnych punktach nawet przesadnie szczegółowe, jak na przykład zamieszczony na str. 80 opis przygotowania żelu poliakrylamidowego.

Pierwsza część rozdziału - Wyniki jest poświęcona charakterystyce pełnych genomów bakulowirusów wyizolowanych z martwych gąsienic szaroteczniczy szarawki (*Dasychira pudibunda*) oraz brudnicy nieparki (*Lymantria dispar*) pochodzących z Rud Raciborskich oraz z Biebrzańskiego Parku Narodowego. Zgodnie z obowiązującymi zasadami nazewnictwa bakulowirusów nadano im odpowiednio nazwy *Dasychira pudibunda nukleopolihedrovirus* (DapuNPV), *Lymantria dispar*

*multinukleopolihedrovirus-RR01* (LdMNPV-RR01) oraz *Lymantria dispar multinukleopolihedrovirus-BNP* (LdMNPV-BNP).

Do detekcji wirusów wybrano odpowiednią do charakteryzowania nowych gatunków wyspecjalizowaną technologię NGS firmy Illumina, która zapewnia najlepszą jakość odczytów. Pełne genomy uzyskane po złożeniu surowych odczytów długości 300 par zasad uzupełniano o sekwencje miejsc niepewnych potwierdzonych metodą sekwencjonowania Sangera. Konieczność przeprowadzenia tej procedury Doktorantka uzasadniła na przykładzie ustalenia konkretnej ramki odczytu. Pełne genomy zostały zdeponowane w bazie danych Genbank. Następnie Doktorantka wykonała anotację genomów wraz z poszukiwaniem sekwencji promotorowych oraz homologicznych powtórzeń. Kompleksowa analiza bioinformatyczna obejmowała określenie zbieżności ułożenia genów w genomach pokrewnych bakulowirusów i przyrównanie konserwowanych rejonów. Analizy filogenetyczne przeprowadzono na bazie sekwencji trzech (*polh/gran*, *lef 8* i *lef 9*) lub wszystkich trzydziestu ośmiu genów stałych bakulowirusów dostępnych w bazie Genbank. Doktorantka wyznaczyła również drzewa filogenetyczne pokrewieństwa wybranych nietypowych lub zduplikowanych białek.

Na uznanie zasługuje szeroki zakres analiz oraz przejrzysta forma przedstawienia wyników w postaci czytelnych rycin oraz tabel, w tym trzech zamieszczonych w Aneksie zawierających skompilowane informacje o wszystkich *orf* zidentyfikowanych w poszczególnych genomach wraz z uwzględnieniem funkcji pełnionych przez kodowane przez nie białka oraz informacji o odpowiednikach oznaczonych *orf* wśród innych bakulowirusów.

Wymienione powyżej analizy wykazały w przypadku wirusa DapuNPV najbliższe pokrewieństwo z alfabakulowirusem OpMNPV odkrytym w znamionówce (*Orgyia pseudotsugata*), która jest owadem występującym wyłącznie w Ameryce Północnej. Porównanie genomów wykazało dużą zbieżność ułożenia genów oraz małą ilość genów, które nie występują jednocześnie w obu genomach. Obok tych podobieństw obserwowano również różnice w zawartości niektórych genów.

W przypadku bakulowirusów wyizolowanych z gąsienic brudnicy nieparki z różnych rejonów geograficznych Polski, przeprowadzona przez doktorantkę analiza filogenetyczna wykazała, że LdMNPV-RR01 ma sekwencję najbliższą do wspólnego przodka spośród wszystkich izolatów LdMNPV, podczas gdy wirus LdMNPV-BNP nie wykazywał pokrewieństwa z pozostałymi wirusami wyizolowanymi z brudnicy nieparki z różnych regionów świata. Na to, że może to być odrębny gatunek wskazywało porównanie typowych elementów genomów. Dodatkowo porównanie sekwencji polihedryny wykazało podobieństwo do wirusa wyizolowanego z brudnicy mniszki - *Lymantria monacha nucleopolyhedrovirus* (LymoNPV).

Dalsza część rozdziału jest poświęcona realizacji drugiego celu pracy, którym było opracowanie metod detekcji i różnicowania izolatów/gatunków betabakulowirusów pochodzących z prób środowiskowych. Doktorantka opracowała dwie metody przesiewowe wykorzystujące MSSCP oraz PCR w czasie rzeczywistym. Obie metody optymalizowała i walidowała wykorzystując DNA genomowe reprezentatywnej dla całego rodzaju *Betabaculovirus* grupy ośmiu gatunków. Jako odpowiednie do odróżniania badanych gatunków wytypowano trzy silnie konserwowane geny *gran*, *lef-8* i *lef-9*, a jako miejsca przyłączenia zaprojektowanych zdegenerowanych starterów wybrano w obrębie genów silnie konserwowane sekwencje otaczające odpowiedniej długości rejony zmienne. W przypadku pierwszej metody różnicowanie odbywało się przez porównanie profili wybarwionych srebrem produktów amplifikacji fragmentów genów *gran* i *lef-9* po rozdiale elektroforetycznym MSSCP, a w przypadku drugiej na podstawie porównania temperatur topnienia produktów PCR trzech genów w czasie rzeczywistym. Obie metody umożliwiły rozróżnienie badanych gatunków w tym również blisko spokrewnionych, a użycie PCR w czasie rzeczywistym dodatkowo także odróżnienie dwóch izolatów jednego gatunku. Świadczy to o trafności doboru technik oraz umiejętności ich zastosowania, co było dużym wyzwaniem biorąc pod uwagę skomplikowaną optymalizację

parametrów rozdziału elektroforetycznego MSSCP. Technika ta jest rozwinięciem klasycznej metody genotypowania opartej o natywną elektroforezę przestrzennych konformerów jednoniciowych cząsteczek DNA (SSCP). MSSCP dodatkowo wykorzystuje skokowe zmiany temperatury w trakcie rozdziału, co zwiększa rozdzielczość, umożliwiając detekcję zmiany pojedynczych nukleotydów. Technologia jest więc z powodzeniem wykorzystywana w wirusologii i onkologii do detekcji znanych oraz odkrywania nowych, nieznanymi wariantów genetycznych, obecnych w badanej próbce, nawet jako mniejszościowe domieszki.

Doktorantka zrealizowała zatem z sukcesem wszystkie zamierzone cele, co omawia w świetle odpowiednio dobranej literatury w zawartej na 13 stronach Dyskusji. Dyskutując perspektywy wykorzystania obu opracowanych metod detekcji i różnicowania betabakulowirusów jako narzędzi do przesiewowego badania prób środowiskowych Autorka zakłada, że opracowana metoda MSSCP umożliwi wykrycie niehomogennej próbki w trakcie jednej analizy, a metoda wykorzystująca PCR w czasie rzeczywistym pozwoli również na odróżnienie wariantów mniejszościowych. Rozważa również zastosowanie metody do rutynowego monitorowania stabilności betabakulowirusów w trakcie ich stosowania jako bioinsektycydów, w celu identyfikacji zarówno szczepów mniej zjadliwych, pojawiających się w wyniku presji selekcyjnej i mogących powodować obniżenie efektywności stosowanego środka, jak również tych o wyższej wirulencji. W tym miejscu warto podkreślić, że najczęściej stosowanym w skali światowej biopestycydem jest preparat oparty właśnie na betabakulowirusie *Cydia pomonella granulowirus* (CpGV), który infekuje owocówkę jabłkowieczkę. Porównując przydatność tych szybkich i relatywnie tanich metod Autorka wskazała na opartą o technikę PCR w czasie rzeczywistym jako bardziej dostępną ze względu na wykorzystanie w niej termocyklera. Urządzeniem tym dysponuje wiele laboratoriów, podczas gdy rozdziały MSSCP wymagają użycia systemu DNA Pointer, który jest specjalistyczną aparaturą opracowaną i produkowaną przez polską firmę BioVectis, w którą wyposażone są jeszcze nieliczne laboratoria.

W kontekście omawianej przez Doktorantkę możliwości wykorzystania obu opracowanych metod do wykrywania wirusów w glebie czy na liściach, istotnym aspektem jest ich czułość. W pracy Rabalska i wsp. (2019) dotyczącej opracowania metody opartej na PCR w czasie rzeczywistym oszacowano poziom detekcji dla amplifikowanych fragmentów genów wybranego wirusa. Czy poziom detekcji wybarwionych srebrem amplikonów po rozdziale MSSCP jest porównywalny?

Druga część Dyskusji dotyczy zidentyfikowanych przez Doktorantkę alfabakulowirusów. Wirusy DapuMNPV i wirus OpMNPV, do którego podobieństwo wykazały przeprowadzone przez Doktorantkę analizy, zostały sklasyfikowane na podstawie kryterium demarkacyjnego w modelu 38-genowym jako dwa izolaty tego samego gatunku. Autorka przyjmuje założenie, że wirusy mają wspólnego przodka lub jeden jest przodkiem drugiego. Ponieważ pochodzą z oddalonych geograficznie gospodarzy, mianowicie *Dasychira pudibunda* występuje w Europie a *Orgyia pseudotsugata* w Ameryce Północnej i brak doniesień o przypadkowym zawleczeniu któregoś z nich na inny kontynent, Doktorantka formułuje hipotezę zgodnie z którą istnieje gatunek owada, który występuje jednocześnie na obu kontynentach, najprawdopodobniej pochodzący również z podrodziny brudnicowatych, który może być zakażony podobnym wirusem.

Natomiast drugi scharakteryzowany przez Doktorantkę izolat LdMNPV-BNP, wykazujący podobieństwo do alfabakulowirusa LymoNPV infekującego *Lymantria monacha*, na podstawie wymienionego powyżej kryterium demarkacyjnego nie został zaliczony do tego samego gatunku z pozostałymi izolatami infekującymi *Lymantria dispar*. Autorka przypuszcza, że w przeszłości, na terenie Biebrzańskiego Parku Narodowego prekursor wirusa LdMNPV-BNP przystosował się do nowego gospodarza - gąsienic brudnicy nieparki. Możliwość zajścia tego wydarzenia uzasadnia specyficznymi warunkami panującymi na terenie Biebrzańskiego Parku Narodowego, stanowiącego odizolowany ekosystem lasu mieszanego, zasiedlony przez różne gatunki należące do Lepidoptera. Odwołuje się również do opisanego w literaturze przykładu znalezienia jednego wirusa u dwóch

gospodarzy z podrodziny brudnicowatych. Doktorantka słusznie zauważa, że hipoteza zgodnie z którą izolat LdMNPV-BNP jest wariantem wirusa LyoMNPV wymaga potwierdzenia, którego dostarczyłoby poznanie pełnego genomu wirusa wyizolowanego z brudnicy mniszki, dla którego dotychczas dostępne są jedynie sekwencje trzech genów.

Wyniki wcześniejszych badań przeprowadzonych w Instytucie Leśnictwa, wykazały zwiększoną wirulencję izolatu LdMNPV-BNP względem gospodarza, dodatkowo Doktorantka stwierdziła obecność w genomie tego bakulowirusa genu kodującego fotoliazę DNA, której aktywność może zapewniać jego stabilność w środowisku. Cechy te wskazują na potencjał izolatu z Biebrzańskiego Parku Narodowego jako biopestycydu. Proszę Doktorantkę o przedstawienie podczas obrony perspektyw praktycznego jego wykorzystania. Czy były już prowadzone próby terenowe? Jeśli tak, to jaką formułą preparatu stosowano? Chciałabym również dowiedzieć się czy dotychczasowe analizy własne Doktorantki lub badania prowadzone w Zespołach Promotorów pozwalają na spekulację jakie czynniki genetyczne decydują o zwiększonej wirulencji izolatu LdMNPV-BNP.

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na pewne błędy, które wynikają zapewne z pośpiechu podczas redagowania pracy:

Na str. 81 Autorka pisze: "*DNA genomowy z ośmiu bakulowirusów posłużył jako matryca w reakcji PCR w celu powielenia krótkich fragmentów genów polh i lef-9 przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu do reakcji PCR*". Podczas gdy powielano fragmenty genów gran i lef-9.

Str.104 znajduje się zdanie: "*Drzewo filogenetyczne na Ryc. 33 [wg 7.13] przedstawia pokrewieństwo sekwencji aminokwasowych białek kodowanych przez geny cbp pochodzące ze wszystkich dostępnych bakulowirusów oraz unikatowe odv-e27l z DapuNPV oraz z LyxyMNPV", mimo, że drzewo filogenetyczne na Ryc. 33 przedstawia pokrewieństwo sekwencji białek kodowanych przez geny odv-e27 oraz unikatowe odv-e27l.*

Na str. 110 i 145 Autorka stosuje termin "rama odczytu", w miejsce poprawnego "ramka odczytu".

Str. 116, podpis Ryc. 46: "*Drzewo filogenetyczne wykonane metodą największego podobieństwa (ML, model GTR+G) przedstawiające pokrewieństwo pomiędzy bakulowirusami wyizolowanymi z rodzaju Lymantria oparte na sekwencjach nukleotydowych gran, lef-8 i lef-9.*" Podczas gdy drzewo filogenetyczne na Ryc. 46 przedstawia pokrewieństwo oparte na sekwencjach nukleotydowych polh, lef-8 i lef-9.

Na str. 117 zostało powtórzone zdanie ze strony 116: "*Tab. 6 (Aneks, rozdz. 11) podsumowuje zebrane informacje na temat zidentyfikowanych orf w genomie LdMNPV-RR01*". W tym miejscu powinna się znaleźć informacja dotycząca Tabeli 7: "*Tab. 7 (Aneks, rozdz. 11) podsumowuje zebrane informacje na temat zidentyfikowanych orf w genomie LdMNPV-BNP*".

Na str. 122 "...(orf89, Tablea XYZ)...." brak właściwego numeru tabeli.

Na str. 151: "*Poznanie pełnego genomu wirusa wyizolowanego z brudnicy mniszki, a nie tylko sekwencji trzech genów (gran, lef-8 i lef-9 – GenBank, 2019) ostatecznie rozwiązały te wątpliwości.*" Powinno być "... sekwencji trzech genów (polh, lef-8 i lef-9 ...".

"*Co ciekawe, badania aktywności biologicznej przeprowadzone w Instytucie Badań Leśnictwa wykazały, że wirus LdMNPV-BNP charakteryzuje się zwiększoną wirulencją względem gąsienic brudnicy mniszki w porównaniu do innych izolatów LdMNPV (Rabalski i Krejmer-Rabalska et al., 2016)*". Natomiast w cytowanej pracy badano wirulencję względem gąsienic brudnicy nieparki.

Na str. 189 w nagłówku tabeli nr 7: "*pozycja ORF określonego dla LdMNPV w genomach innych gatunków*" brakuje pełnej nazwy izolatu: "*pozycja ORF określonego dla LdMNPV-BNP*".

Ponadto w tekście występują inne błędy literowe i edycyjne, których nie wymieniam. Powyższe uwagi nie zmieniają jednak mojej pozytywnej oceny rozprawy.

Nawet jeśli to nie jest wymóg formalny, to wskazane byłoby zamieszczenie w rozprawie wykazu prac, w których opublikowano wyniki będące przedmiotem rozprawy oraz źródeł finansowania badań, szczególnie, że zgodnie z informacjami zamieszczonymi w publikacjach Doktorantka była kierownikiem grantu Preludium finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Świadczy to wymownie o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Warte zauważenia jest również to, że mgr Martyna Krejmer-Rąbalska jest współautorką trzech dodatkowych prac badawczych, z których jedna została opublikowana w 2018 roku w *Journal of Invertebrate Pathology* (5-letni współczynnik oddziaływania czasopisma 2.535), a dwie w 2017 roku w *International Journal of Molecular Sciences* (5-letni współczynnik oddziaływania czasopisma 4.331). Powyższe wskazuje na duże zaangażowanie Kandydatki w działalność naukową.

Podsumowując, oceniana rozprawa w pełni odpowiada warunkom Ustawy z dn. 14 marca 2003r. o stopniach i tytule naukowym oraz Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. z 2018, poz.261). W mojej ocenie dorobek naukowy Kandydatki uzasadnia nadanie Jej stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne, wnoszę zatem do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o dopuszczenie mgr Martyny Krejmer-Rąbalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Ewa Szolajska