

Report on Ph.D. thesis

Ing. Tatina Sarkisova: Molecular analysis and genetic identification of a new potyvirus and phytoplasma plasmids

Identification and characterisation of pathogens by molecular methods are the modern approach in pathogen diagnostics and taxonomy. The submitted Ph.D. thesis deals with molecular description of new species from genus *Potyvirus*, which infects garden lupine (*Lupinus polyphylus*). The second part is aimed at molecular characterisation of phytoplasma plasmids by sequencing and comparison of these sequences. The Ph.D. thesis is divided in several parts (chapters), which are not so typical for this type of final work, but they are sufficient.

In the beginning of the work main aims of the study are listed. One of these aims, the screening samples from family Fabaceae for the viral and phytoplasmas infection is stated. Have you found any phytoplasmas on lupine?

Chapter 1 is literary review, basically. The origin of viruses, virus evolution by mutation and some recombination and reassortment events are described in the first part. The term virus quasispecies is mentioned, too. The second part is devoted to viruses on legume plants. As these species are important crops in different parts of the world, many publications are cited. In my opinion, from the historical point of view, at first the surveys in which serological methods were used for determination should be cited and then publication in which molecular methods were carried out (p.21 and p. 22). As it is correctly mentioned, molecular analysis is the base for classification of genera, species and strains and that molecular criteria are not identical for all genera. In the next part, these criteria for classification of genus *Potyvirus* are described. Phytoplasmas, their plasmids and possibilities of using plasmid sequences in phylogenetic relationships are also quoted. Material and methods is subchapter following the literary review. In my opinion, it should be as a separated chapter. Methods are described broadly including list of chemicals (enzymes, primers), equipment, the methods of virus purification, different steps of molecular analysis (NA extraction, PCR, DNA sequencing etc.). The methods of data analysis are included, too. For the ^{best} ~~best~~ orientation, the list of phytoplasma samples collection from Italy should be included with the data of origin (phytoplasma species, classification, and plant species).

In the chapter 2, the results of molecular analysis of new identified member in genus *Potyvirus*, *Lupine mosaic virus* (LuMV), ^{is} ~~are~~ mentioned. Sequences of bases and amino acids

of whole LuMV genom and particular proteins (e.g. coat protein, replicase, Hc-Pro, P3 etc.) are quoted. On these bases phylogenetic relationships among LuMV and other close related potyviruses are established and LuMV was determined as a new virus species. These results were published in two journals with so called impact factor (IF).

- Why different virus species were used in phylogenetic analysis for different virus proteins and regions of genome?

Chapter 3 is devoted to summary of screening phytoplasma infected samples for the plasmid presence, detection of plasmids by using specific primers for *rep* genes and sequence analysis of extrachromosomal DNA from selected phytoplasmas. It is very interesting, phylogenetic relationships of plasmid sequences are not the same as for phytoplasma genomes. Some of these results were published in one IF journal.

- Are there any implications of discrepancies between phylogenetic analysis according to plasmids and whole genom for the phytoplasmas taxonomy?

In chapter 4, the general discussion is made. Obtained results are compared with data from publications of many different authors and it is very well prepared

- *Polymyxa graminis* is not fungus, but fungal like organism (Protista).

The Ph.D. thesis of Ing. Tatiana Sarkisova has excellent quality, the results of her work are pioneering, they were published in several journals with IF. **I recommend this thesis to be accepted and to cap Ph.D. title to the applicant.**



Prof. Ing. Radovan Pokorný, Ph.D.

Brno 6.11.2013

Oponentský posudek doktorandské disertační práce

Molecular analysis and genetic identification of a new potyvirus and phytoplasma plasmids

Pracoviště: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta
Autor: Ing. Tatiana Sarkisová
Vedoucí práce: Doc. RNDr. Karel Petrzik, prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Rok odevzdání práce: 2013

Disertační

Disertační práce je zpracována v anglickém jazyce, klasickým způsobem na celkem 93 číslovaných stránkách. Skládá se z kapitol Úvod (General Introduction), Cíle (Objectives), Kapitola 1 (Chapter 1: Origin of viruses, Virus evolution, Viruses on legume plants of family *Fabaceae*, Phytoplasmas and their plasmids, Materials and methods), Kapitola 2 (Chapter 2 – Results: Molecular analysis of *Lupine mosaic virus*, LuMV – a new member in genus *Potyvirus*, Analysis of LuMV RNA sequence), Kapitola 3 (Chapter 3 – Results: Summary of screening phytoplasma infected samples for plasmid presence), Kapitola 4 (Chapter 4 – General Discussion: The complete nucleotide sequence of *Lupine mosaic virus*, LuMV – a new member in genus *Potyvirus*, Screening samples for plasmid presence including partial sequenced pBVK and pKEY), Závěr (Conclusion), Použitá literatura (References). Přestože je práce zpracována klasickým způsobem, její členění je poněkud neobvyklé. Dávám jednoznačně přednost klasickému členění na Úvod, Literární přehled (Introduction), Cíle práce (Objectives), Materiál a metodika (Material and Methods), Výsledky (Results), Diskuse (Discussion), Závěr (Conclusions), Literatura (References).

V první části (General Introduction) autorka práce představuje čeleď *Fabaceae* jako jednu z hospodářsky nejvýznamnějších skupin rostlin a dále fytoplazmy a jejich plazmidy.

Kapitola 1 je sice napsaná přehledně a čtivě, nicméně její první dvě části podle mne nesouvisí s řešenou problematikou (1.1 Origin of viruses, 1.2 Virus evolution, 1.2.1 Mutation, 1.2.2 Recombination and reassortment). V další části autorka představuje jednotlivé viry infikující zástupce čeledi *Fabaceae*. Očekával jsem výčet nejvýznamnějších virových druhů a jejich základní charakteristiky. Již na druhé stránce textu (str. 21 – 24) však autorka toto téma opouští a podle mne se nelogicky zabývá škodlivými viry v Africe, diagnostikou virů nebo problematikou stanovení virového druhu a klasifikací potyvirů. Zařazení dalších informací o čeledi *Potyviridae* jako podkapitoly (1.3.1, 1.3.1.1) je zbytečné. Autorka se měla věnovat problematice vymezení čeledi *Potyviridae* a rodu *Potyvirus* včetně taxonomických problémů a otázek v samostatné kapitole. Část zabývající se problematikou fytoplazem a jejich plazmidů je zpracována přehledně, jsou v ní uvedeny všechny základní recentní informace.

Kapitola Materiál a metodika popisuje stručně použité metody a vzorky biologického materiálu. Popisy metod jsou stručné, nicméně obsahují veškeré nezbytné informace. K metodice mám následující připomínky: Tabulka na straně 32 má nízkou kvalitu, její zpracování by si zasloužilo větší pečlivost; str. 34: buffer containing ?; N-acetate; 1.5.7 RNA/DNA isolation by RNA Plant Kit?; 1.5.8 opakuje se první věta; 1.5.9 nelogický název; Phi 29 je fág ne enzym; 1.5.11 má nelogický název of/or; sequencing into nedává smysl; návrh primerů není součástí 1.5.15. Škoda, že se v anglickém textu objevuje mnoho překlepů a stylistických nejasností.

Výsledky jsou prezentovány jasně. Některých jejich částí jsou zpracovány jako diskuse, která má být samostatnou kapitolu. Výsledky spojené s popisem 'nového' potyviru LuMV byly publikovány ve třech člancích, z toho dva v časopisech s IF (Acta Virologica, Archives of

Virology), v obou případech je Tatiana Sarkisová první autorkou. Druhá část výsledků zaměřená na charakteristiku plazmidů fytoplazem je zpracována podstatně lépe. Výsledky byly již publikovány jako dva příspěvky na konferencích; v jednom případě vyšel příspěvek v časopise s IF.

Z výsledků považuji za velmi hodnotný popis potenciálně nového druhu viru *Lupinus mosaic virus* a jeho detailní molekulární charakterisku. Dále potom prohloubení poznatků o plazmidech fytoplazem založené na analýze *rep* genu. Následuje přehledná a přesná diskuse.

K prezentovaným výsledkům mám následující dotazy:

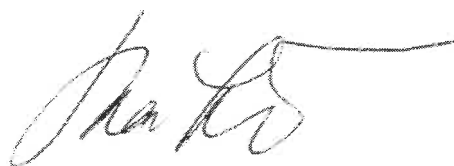
- 1) Jakou váhu přikládáte molekulárním parametrům umožňujícím popsat 'nový' potyvirus? Brala jste v úvahu jeho biologické-ekologické vlastnosti; pokud ano, kterým dáváte největší význam?
- 2) Testovala jste okruh hostitelů LuMV (např. hrách, fazol atd.)?
- 3) Jakou roli hrají fytoplazmové plazmidy v jejich fitness?

Závěrem mi dovoluete stručné zhodnocení práce. Předložená disertační práce svědčí jak o vysoké odborné erudici uchazeče, tak o jeho pracovitosti. Nicméně text a jeho členění vykazuje řadu nedostatků převážně formálních nedostatků. Vzhledem ke skutečnosti, že výsledky byly již publikovány ve třech článcích v časopisech s IF a sám je hodnotím pozitivně, považuji odborný obsah práce za odpovídající požadavkům na disertační práci.

Vzhledem ke kvalitě výsledků předloženou práci k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby navrhuji udělit Ing. Tatianě Sarkisové akademický titul „philosophiae doctor“ (Ph.D.) dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Olomouci 29. 10. 2013

prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.





Akademie věd České republiky

Ústav experimentální botaniky, v.v.i.

Rozvojová 313
165 02 Praha 6

tel.: +420 225 106 819
e-mail: cerovska@ueb.cas.cz

Oponentský posudek disertační práce

Doktorand: Ing. Tatiana Sarkisova

Název práce: Molecular analysis and genetic identification of a new potyvirus and cytoplasmic plasmids

Rozsah disertace: 93 stran textu

Oponent: Doc. RNDr. Noemi Čeřovská, CSc.

Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Praha

Disertační práce byla zaměřena na molekulární analýzu a genetickou identifikaci nového potyvirusu a molekulárně biologickou charakterizaci plazmidů fytoplazem. Cílem práce bylo zkoumání vzorku čeledi *Fabaceae* na přítomnost virové a fytoplazmové infekce. Pomocí metod multiple alignmentu a fylogenetické analýzy byl charakterizován nový *Potyvirus-Lupine mosaic virus* (LuMV, který je velmi blízce fylogeneticky příbuzný s *Lettuce mosaic virus* (LMV)). Kompletní nukleotidová sekvence LuMV byla vložena do databáze GenBank. V druhé části práce byla provedena analýza 37 vzorků infikovaných fytoplazmami na přítomnost plazmidů fytoplazem. Výsledkem studia plazmidů fytoplazem bylo zjištění, že jejich přítomnost ve fytoplazmách je obvyklý jev, a že jejich fylogenetická příbuznost nekoresponduje s příbuzností fytoplazem ve skupinách a podskupinách. Plazmidy byly částečně sekvenovány a na základě získaných sekvencí byla provedena jejich molekulárně biologická charakterizace.

Zvolené téma, týkající se problematiky, jejíž řešení má v týmu Doc. RNDr. Karla Petrzika, CSc. dlouhou tradici, je nejen aktuální, teoreticky i prakticky potřebné, ale i obtížné a náročné.

Vytčené cíle byly doktorandkou splněny a publikace vzniklé během řešení disertační práce jsou přínosem k základnímu výzkumu v rostlinné virologii.

K vlastnímu řešení přistoupila autorka po důkladném shromáždění a osvojení si doposud publikovaných poznatků z této oblasti.

Řešením doktorské disertační práce byla získána celá řada významných originálních poznatků na úseku molekulárně biologické analýzy a genetické identifikace rostlinných virů a fytoplazem. Obzvláště zajímavá je detekce a analýza nového potyvirusu *Lupine mosaic viru* a fylogenetické analýzy extrachromozomální DNA fytoplazem. Výsledky práce jsou shrnuty ve čtyřech publikacích uveřejněných v impaktovaných časopisech a několika příspěvcích na konferencích.

Po formální stránce musím práci vytknout jistou nedopracovanost, neopravené překlepy a mnoho chyb v angličtině. Je škoda, že tyto formální nedostatky snižují jinak příznivý dojem z obsahové náplně práce.

Jelikož podstatná část disertační práce prošla recenzním řízením v uvedených časopisech, k práci bych měla pouze následující dotazy a připomínky:

- 1) Jaká jsou obecná pravidla pro určení nového rostlinného viru? Jsou tato pravidla různá pro různé rody?
- 2) Existují důkazy o možné koexistenci několika různých plazmidů v jednom fytoplazmovém hostiteli? Jsou fytoplazmové plazmidy kompatibilní?

Práce Ing. Sarkisove splňuje podmínky kladené na disertační práci, neboť doktorandka v předložené práci prokázala dostatečnou schopnost orientace ve světové literatuře, kriticky třídit informace a využívat je pro vlastní řešení. V práci přináší důkazy o samostatném tvůrčím přístupu, který byl završen řadou výsledků, které jsou přínosem pro základní výzkum rostlinných patogenů.

Na základě této skutečnosti doporučuji práci k obhajobě a po uspokojivém zodpovězení dotazů doporučuji udělení titulu PhD. podle stávajícího vysokoškolského zákona a prováděcích předpisů MŠMT.

V Praze, 4.11. 2013

Doc. RNDr. Noemi Čeřovská, CSc.

ÚEB AV ČR, v.v.i., Praha