

Review of PhD thesis

Title of PhD thesis: Effect of the Cry3 toxins on beetles

Author: Moataz Mostafa

Supervisor: Prof. Ing. František Sehnal, CSc.

Biology Centre of the Academy of Sciences of Czech republic, Institute of Entomology,
České Budějovice

Reviewer: Prof. Ing. Ludovít Cagáň, CSc., Slovak Agricultural University in Nitra, Slovakia

The thesis of Mr. Mostafa try to solve a very actual problem concerned to Cry toxins and pest beetles.

The thesis are concerned to Cry3 toxins and their effect to two beetle species. I suppose that this should be more clearly shown in the thesis title. The title of thesis seems as a title of some book, not the thesis. It is too general and does not describe precisely the content of thesis.

Chapter "Methodology" can be used as an instruction for any researcher in this field of study. If Journal of Applied Entomology accepted the paper of Mr. Mustafa as the first author, I do not need to comment the results more. Only I need to add, that corresponding author of the manuscript was Prof. Sehnal.

Our experiments with *Ostinia nubilalis* larvae and powder from MON 810 maize showed, that it is not so easy to kill the larvae. The literature informed that Bt toxin is killing the larvae, but our larvae survived on diet with Bt-maize powder more than one month. But the larvae did not feed and did not grow. They were long time in the same size. So I do not like the figures with the mortality of larvae caused by Bt toxins and I would like to ask about the time. The time of the development, the time when the insects died. At pages 63 and 64 of thesis it is the situation after 10 days? Could you please explain, what was the situation after longer period of feeding? Or shorter?

Chapter 3 shows the results concerned to cadherin gene expression in distant populations and different developmental stages and tissues of *Tenebrio molitor*. Even abstract explain a lot about the aim of the study, it would be probably necessary to explain clearly the aim in introduction. It is also not usual if chapter "Material and methods" follows the chapter "Discussion". I suppose that author need to follow more his own results in discussion. Discussion could not start with the next "introduction" and it would be probably better to support the ideas and opinions in discussion with some ideas from other literature.

In suppose that reviewers of paper in chapter 4 will have more question concerned to the aim of study and they will be not satisfied enough with discussion.

Conclusions show the contribution of the PhD thesis to the science and I agree with the author. I do not think that author needs to explain his future plans and probably he could speak more about practical impact of his current results.

I am not very familiar with the type or format of submitted thesis. The results of nominee are all time covered by other co-authors (usually corresponding authors) and it is often not so easy to define the work of PhD student and his co-operators or supervisor.

In any case, I am sure that all work was done by applicant and I would like to express my opinion that I agree with submitting of the thesis to commission and I support the defence of thesis with positive result.

I recommend to award the author of thesis with the degree PhD.

Nitra, April, 9, 2013

Ludovít Cagán

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'L. Cagán', written over the printed name.

Posudek na disertační práci

Autor: Moataz Mostafa

Název práce: Effect of the Cry3 toxins on beetles

Předmětem disertační práce je studium vlivu toxinu Cry3 *Bacillus thuringiensis* na trávicí soustavu dvou druhů potěmnikovitých, *Tribolium castaneum* a *Tenebrio molitor*. Přestože mechanismus vlivu *B. thuringiensis* je studován již dlouho, jde o zajímavou problematiku. Je to zejména proto, že dřívější pozornost byla zaměřena na studium druhů řádu Lepidoptera, kde je praktické využití *B. thuringiensis* nebo jeho toxinů nejvýznamnější. Práce se tabývá prověřením sensitivity k Cry3A toxinu u populací *T. castaneum* a identifikací přítomnosti jeho receptoru cadherinu v různých vývojových stádiích a tkáních *T. molitor*, s možným využitím ke zvýšení účinku toxinu v larvách brouků. Cílem výzkumu struktury toxinu a jeho receptorů je rozšíření palety biopesticidů na bazi Cry toxinů s cílem zasáhnout nové druhy škůdců a zvýšit sensitivity jejich populací k toxinu.

Práce (99 stran textu) se skládá z úvodní informace podrobně popisující stav znalostí problematiky (19 stran textu + 14 stran citované literatury), stanovení cílů projektu (1 strana textu) a podrobného popisu metodiky (11 stran). Dále obsahuje text tří publikací. Práce, kde disertant je prvním autorem tříčlenného kolektivu byla přijata do tisku v *European Journal of Entomology* (21 stran MS). Druhá práce, kde disertant je prvním z dvojice autorů, byla zaslána do tisku pro *Biological Chemistry* (17 stran MS), třetí publikace je v přípravě pro zaslání do tisku a disertant je prvním autorem ze čtyřčlenného kolektivu (9 stran MS). Thesi uzavírá shrnutí (3 strany textu).

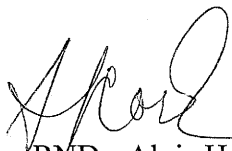
Po formální stránce je disertační teze na dobré úrovni. Literární přehled je napsán velmi přehledně a poskytuje širokou informaci o problematice využití *B. thuringiensis* a odvozených biopesticidů jako prostředků pro snížení rychlosti vývoje rezistence škůdců, s poměrně vysokou specificitou účinku pro cílové organismy. Podrobně jsou vyloženy znalosti Cry toxinu a jeho receptorů cadherinů v buněčné membráně, které jsou relevantní pro výsledky obhajované disertace. Podle struktury citovaných prací (periodik, ve kterých byly uveřejněny a dat publikace) se domnívám, že přehled je na odpovídající úrovni. Metodika je popsána velmi podrobně (jak to umožňuje nelimitovaný rozsah disertace) a domnívám se, že její popis by umožnil replikaci všech postupů použitých ke získání publikovaných výsledků. Rukopisy

prací, které tvoří výsledkovou část, mají všechny, včetně textu teprve pro publikaci připravovaného, formální a věcnou úroveň odpovídající možnosti přijetí v cílových periodikách s if. Závěrem disertant shrnuje výsledky své výzkumné činnosti a podává rozvrh jejího dalšího možného pokračování. Velmi oceňuji, že celá These je napsána stručným a přístupným způsobem.

Výsledkovou část tvoří MS tři publikací. První publikace přijatá do tisku v EJE (if=1.061) již prošla rigorosním oponentním řízením a tvoří „tvrdý“ základ pro hodnocení relevantnosti předložených výsledků pro požadavky získání titulu PhD. Druhý MS v současnosti v recensním řízení v Biological Chemistry (if=2.965) je rovněž kvalitním příspěvkem, který jistě nakonec vyjde v periodiku odpovídající úrovně. Třetí MS v přípravě pro dosud neurčené periodikum má obsahově a formálně všechny náležitosti nutné k zaslání do recensního řízení, a to rovněž v impaktovém periodiku. V hodnocení kvality publikací se shodují s názory kompetentních recenzentů pověřených redakcemi příslušných časopisů. Vlastní dotazy a připomínky nemám.

U předkládané Teze oceňuji nejen její invenční a metodickou úroveň, ale rovněž, a to velmi vysoko, její zaměření k orientovanému výzkumu a případným aplikovaným výsledkům. Vysoká selektivita a toxicita biopesticidů založených na bazi toxinů *B. thuringiensis* je nadějnou alternativou ve vyhledávání kombinací pesticidů vhodných pro oddálení vzniku rezistence bezobratlých škůdců, členovců a hád'átek, v zemědělských a lesnických kulturách.

Dizertační práci považuji za zdařilou a vyhovující kritériím získání titulu PhD a navrhuji, aby autorovi byl po obhájení práce tento titul udělen.


doc. RNDr. Alois Honěk, CSc.

V Praze, dne 29.3.2013

EXPERT OPINION

PhD Thesis

Effect of the Cry3 toxin on the beetles

Author: Montaz Mostafa

by Jaroslava Ovesná

Crop Research Institute, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 Ruzyně

The work aimed to contribute to better understanding of *Cry3* endotoxin activities and use the information in the development and improvement of *B. thuringiensis*-based pesticides. Detailed structural and biochemical knowledge of the Cry toxins and their action was expected to be necessary for the purpose. On the basis of such knowledge one could redesign toxin structure to customize them to desired host range, alter activity, improve stability, and delay or overcome resistance.

The thesis consists of five chapters, the first one represents body of the thesis, chapter 2 is represented by published article in peer reviewed journal, chapter 3 is represented by submitted manuscript and chapter 4 by manuscript in preparation, chapter 5 aimed to present overall conclusions of the work.

The first part includes a type of literature overview that is straightforward, clear and understandable, followed by objectives, which I prefer to have at the beginning of the thesis for better orientation of reader. I would prefer less descriptive, more condensed text of this part. Methodology is comprised in subsequent part. It is apparent, that author has had to encompass wide scale of molecular method ranging from RNA isolation and purification, cDNA synthesis, PCR, DNA cloning and sequencing, but also insect rearing, toxin isolation and others. This documents very good laboratory skills of the author. The part is finished by list of references.

The second chapter is represented by article Activities of modified Cry3A-type toxins on the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst). Journal of Applied Entomology (accepted) by Moataz A.M. Mostafa, Josef Vlasák and František Sehnal. The article focuses on preparation of 19 recombinant modifications of Cry3A protoxins. They were tested on the larvae of *T. castaneu*, however, the derivatives were not more effective than natural protein. I would like to ask, if these preparation may be effective against other pests, whether other types of modification(s) of natural protein may reach the goal and help in protection against *T. castaneu*.

The chapter 3 introduced by manuscript submitted by Moataz A.M. Mostafa and František Sehnal into Biological Chemistry named Cadherin gene expression in distant populations and different developmental stages and tissues of *Tenebrio molitor*. Article deals with as cadherin a

putative receptor of the *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. The study demonstrates high conservation of the codon usage and of deduced amino acid sequence of this cadherin among a Czech, Romanian and US populations of *T. molitor*. However I have not noticed any extensive sequencing of the gene or domain from various sources in the publication. E.g. sequencing of corresponding amplicons from various strains coming from different part of the world. Can author elaborate a bit on that ? Does author expect different alleles or different loci in the genome ?

The last article presented as chapter 4 is in preparation with provisional title Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxicity to coleopteran larvae by a *Tenebrio molitor* cadherin fragment, CR12-MPED. In this paper author show that recombinant protein CR12-MPEDp, which included cadherin region CR12 and adjacent membrane-proximal extracellular domain MPED also enhanced the efficacy of Cry3Aa in tests on the larvae of *T. molitor*. Article aims to bring evidence that different beetles of the same family may differ in the binding mechanism and thus in sensitivity to Cry toxin.

Authors has not presented any other published contributions, although he presented extensive work. I would like to know how he will further disseminate his knowledge.

The ovelall objectives of the work were fulfilled. The work may have beside its scientific value also practical applications as the insecticidal Cry proteins are effective in killing a wide range of insect pests. The understanding the mode of action of the Cry toxins is essential for designing strategies to improve their activity and to counter pest resistance. The work contributed to this aim in three areas.

- Identification of Cadherin 1 protein as a putative Cry3 receptor gene
- Activities of modified Cry3A-type toxins on the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst)
- Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxicity to coleopteran larvae by a *Tenebrio molitor* cadherin fragment, CR12-MPED.

The author of the PhD thesis proved its ability to scientific work, work with scientific literature, laboratory skill and results interpretation. He has publish one paper in peer reviewed journal Biological Chemistry with current impact factor 2.965, two others have been prepared.

Author, from my point of view, fulfilled the requirements for the thesis and thus I recommend to allocate PhD

Jaroslava Ovesná

