

Dr hab. inż. Zdzisław Klukowski, prof. UP.
Katedra Ochrony Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
50-363 Wrocław
Pl. Grunwaldzki 24a

Wrocław, 23-06-2014

RECENZJA

osiągnięcia naukowego, stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego oraz dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego Dr Iwony Sprawki

Dr Iwona Sprawka studia magisterskie ukończyła w roku 1989, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Stopień magistra o specjalności biologia molekularna uzyskała na podstawie pracy pt: Badanie elektroforetyczne aktywności proteolitycznych i keratynolitycznych *Trichophyton gallinae* oraz *Trichophyton verrucosum*, napisanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Łobarzewskiego. Zainteresowania naukowe kontynuowała dalej, jako asystent Katedry Biochemii Klinicznej i Toksykologii Środowiska Akademii Medycznej w Lublinie. Pierwszy rok swojej pracy zawodowej poświęciła na poznanie technik i specyficznych metod badawczych związanych z biochemią kliniczną oraz dermatologią. Po urlopie wychowawczym (1990-1993) podjęła pracę w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej Wyższej Szkoły Rolniczo-Pedagogicznej (WSRP) w Siedlcach. W okresie 1993-2001 zatrudniona była na stanowisku asystenta. Obrona pracy rozprawy doktorskiej na temat: Zmiany w zawartości i składzie aminokwasowym białek pszenżyta ozimego wywołane zerowaniem mszycy zbożowej (*Sitobion avenae* F.) miała miejsce w 2001r. Promotorem pracy był prof. dr hab. Antoni P. Ciepiela. Od 1-10-2001r. zatrudniona na stanowisku adiunkta, a od 2013r. na stanowisku starszego wykładowcy. Habilitantka nieprzerwanie pracuje w tej samej instytucji do chwili obecnej, tj. Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej, Wydziału Przyrodniczego, Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach (wcześniejsze zmiany nazewnictwa).

Wykonana przeze mnie recenzja została przygotowana w oparciu o dwujęzyczne materiały (polski, angielski) obejmujące:

- autoreferat, w którym Habilitantka przedstawia przebieg swojej kariery naukowej, prezentuje CV, omawia także całość dorobku naukowego przed i po uzyskaniu stopnia

doktora ze wskazaniem osiągnięcia stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego – jest to cykl pięciu oryginalnych publikacji na temat: **Mechanizm toksycznego oddziaływania lektyny izolowanej z fasoli zwykłej (*Phaseolus vulgaris* L.) na mszycę zbożową (*Sitobion avenae* F.),**

- wykaz opublikowanych przez Habilitantkę prac naukowych w tym referatów i doniesień wygłoszonych na konferencjach naukowych,
- kopie wybranych publikacji naukowych nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego,
- informacje o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i innej działalności akademickiej i popularyzującej naukę.

I. Ocena osiągnięcia naukowego Habilitantki

Przedłożony do oceny **cykl 5 publikacji** opisujący mechanizm toksycznego oddziaływania lektyn na *Sitobion avenae* F., realizowany był w następujących etapach badawczych:

1. analiza porównawcza wpływu wybranych białek na przeżywalność mszycy zbożowej - etap wstępny, skринingowy
2. określenie wpływu lektyny - fitohemaglutyniny (PHA) na bionomię i parametry populacyjne, a następnie ocena jej oddziaływania na parametry behawioralne mszycy zbożowej w trakcie żerowania – testy przyżyciowe in vitro.
3. określanie wpływu fitohemaglutyniny na aktywność enzymów mszycy; uczestniczących w przyswajaniu cukrowców, białek, metabolizmie fosforu oraz wybranych enzymów biorących udział w detoksykacji związków toksycznych;
4. charakterystyka indukowanych zmian w komórkach przewodu pokarmowego *Sitobion avenae* pod wpływem fitohemaglutyniny - procedura zwrotna sprawdzająca.

Założony przez Habilitantkę harmonogram badawczy prac był prawidłowy i z metodycznego punktu widzenia niemal w całości zrealizowany.

W pracy rozpoczynającej cykl publikacji (publikacja nr 1) zamieszczono wyniki badań *in vitro* opisujące wpływ wybranych białek (m. in. bromelaina, lizozym, konkanawalina A, lektyna zarodka pszenicy) na wybrane parametry przyżyciowe mszycy zbożowej.

W testach entomologicznych wykazano, że badane lektyny roślinne, które w największym stopniu ograniczają ilość przyswojonego pokarmu, mają także właściwości

deterentne. Są one prawdopodobnymi silnymi inhibitorami wzrostu tego gatunku. Wyniki zawarte w tej publikacji zwróciły uwagę Habilitantki na właściwości lektyn roślinnych, nie badano w niej jednak jeszcze fitohemaglutyniny (PHA). Badania nad wpływem fitohemaglutynin podjęto dopiero w kolejnych publikacjach. W celu określenia wpływu substancji potencjalnie aktywnych biologicznie dla owadów analizowane są zazwyczaj zmiany typowych parametrów przyżyciowych mszycy: masa i barwa ciała, liczebność potomstwa, czas rozwoju poszczególnych pokoleń, śmiertelność, ilość wydalanej spadzi, płodność, czy długość okresu przedreprodukcyjnego. Stwierdzono, że zawarta w płynnych dietach fitohemaglutynina oddziałuje negatywnie na dwa z wymienionych parametrów: płodność mszycy zbożowej oraz czas trwania okresu przedreprodukcyjnego. W rezultacie owady pobierające z pokarmem fitohemaglutyninę charakteryzowały się wydłużeniem średniego czasu rozwoju pokolenia (T) oraz niskimi wartościami wskaźnika wrodzonego tempa wzrostu populacji (rm). Toksyczny wpływ tej substancji przejawiał się w praktyce także podwyższoną śmiertelnością osobniczą. W kolejnym etapie badań Habilitantka oceniała wpływ PHA na behavior żerowania. W badaniu EPG stwierdzono redukcję aktywności sztyletów, oraz redukcję aktywności związanej z wydzielaniem śliny, a przy wyższych stężeniach PHA całkowite hamowanie pobierania pokarmu.

W ostatnim etapie badań wyjaśniano podłoże toksyczności lektyn w kontekście ich interakcji z enzymami owadów, prowadzącymi do zaburzeń metabolizmu owada. Wykazano, że tylko obecność PHA w pokarmie mszyc wywoływały deregulację aktywności b-glukozydazy oraz fosfatazy kwaśnej w tkankach żerujących owadów. Ponadto, testowana lektyna stymulowała aktywność katepsyny L, hamując aktywność drugiej z badanych proteaz, aminopeptydazy N. Habilitantka badając wpływ fitohemaglutyniny na indukcję apoptozy stwierdziła również, że komórki nabłonka jelitowego owadów żerujących na dietach z jej zawartością odznaczały się podstawowymi cechami charakterystycznymi dla komórek apoptycznych :

- tzw. „drabinkowym” obrazem DNA w otrzymanych elektroferogramach;
- indukcją aktywności kaspazy 3, kluczowego enzymu (kaspaza wykonawcza) uczestniczącego w szlaku apoptozy.

Przedstawione wyniki badań w publikacjach składających się na prezentowane osiągnięcie naukowe wykazały, że fitohemaglutynina charakteryzuje się toksycznym oddziaływaniem w stosunku do *Sitobion avenae* F. Jej owadobójcze właściwości związane są z:

- właściwościami deterentnymi (hamowanie żerowania),

- ingerencją w aktywność enzymów prowadzącą do zaburzeń ich funkcji, a w rezultacie do szkodliwego wpływu na metabolizm owada,
- cytotoksycznością skutkującą zaburzeniami morfologiczno - fizjologicznymi przewodu pokarmowego powodującymi wzrost śmiertelności owadów.

Uzyskane wyniki mają wartość poznawczą i użyteczną, mogą zostać wykorzystane w biotechnologicznych projektach związanych z hodowlą roślin odpornych na roślinożerne owady. Poszerzają też wiedzę z zakresu biologicznych strategii ograniczania populacji fitofagów, zwłaszcza niewrażliwych na syntetyczne środki owadobójcze.

II. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Od początku pracy w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej Wyższej Szkoły Rolniczo-Pedagogicznej (WSRP) w Siedlcach, dr Iwona Sprawka zajęła się problematyką biochemicznych i molekularnych oddziaływań roślina - roślinożerny owad. W ogólnym zarysie problematyka jej zainteresowań obejmuje mechanizmy biochemiczne naturalnej odporności roślin na żerowanie mszyc. Zdecydowana większość jej dorobku naukowego zawarta jest w właśnie w tej tematyce.

Główny nurt badań Habilitantki dotyczy mszyc: *Sitobion avenae* F., *Metopolophium dirhodum* Walk., *Rhopalosiphum padi* L. i ich interakcji z odmianami zbóż charakteryzującymi się różnym stopniem akceptacji żerowania tych fitofagów. Podjęła ona badania nad rolą białek prostych, tzn. albumin, globulin, prolamin i glutelin w oddziaływaniach zachodzących między mszycą zbożową (*Sitobion avenae* F.) a pszenżytem ozimym. Wyniki tych obserwacji pozwoliły wytypować do dalszych badań biochemicznych odmiany różniące się akceptacją żerowania. Następnie wykazano, że do czynników kształtujących zróżnicowany poziom akceptacji odmian pszenżyta ozimego należą zwłaszcza albuminy i globuliny. Badania te stały się kanwą rozprawy doktorskiej pt: Zmiany w zawartości i składzie aminokwasowym białek pszenżyta ozimego wywołane żerowaniem mszycy zbożowej (*Sitobion avenae* F.)" (promotor - prof. dr hab. Antoni P. Ciepiela). Praca ta dostarczyła przede wszystkim nowych informacji uzupełniające charakterystyki odmianowe badanych odmian pszenżyta w zakresie ich naturalnej odporności na mszyce zbożowe.

Jednak odżywcza wartość białek roślinnych nie zawsze korzystnie wpływa na wzrost i rozwój mszyc. Do tej grupy należą inhibitory enzymów proteolitycznych, wykazujące przede wszystkim aktywność antytrypsynową. Zagadnienie to było przedmiotem

kolejnych badań dr. Iwony Sprawki. Wykazała ona, że żerowanie mszyc indukowało znaczący wzrost aktywności antytrypsynowej w tkankach zbóż zaatakowanych niż u roślin kontrolnych. Na organach odmian charakteryzujących się niższym zagęszczeniem populacji *S. avenae* było ono znacznie wyższe. Można więc wnioskować, że wzrost aktywności antytrypsynowej w tkankach zaatakowanych przez *S. avenae*, był wynikiem reakcji rośliny na atak fitofaga. Następowo wówczas szybkie nagromadzenie inhibitora trypsyny, co mogło stanowić jeden z elementów reakcji obronnej rośliny. Szkoda, że Habilitantka nie podjęła dalszych badań nad bliższym opisem mechanizmu aktywacji tego inhibitora. W innych publikacjach dr Iwona Sprawka we współpracy z dr hab. Grzegorzem Chrzanowskim wykazała, że:

- rośliny pszenżyta charakteryzujące mniejszą akceptacją przez mszycę zbożową odznaczały się wyższą zawartością wybranych kwasów fenolowych i równocześnie reagowały na żerowanie wzmożoną ich biosyntezą, wskazując na rolę aktywności amoniako-liazy - L-fenylalaniny i L-tyrozyny (PAL/TAL) zaangażowanej w ich syntezę,
- odmiany pszenicy i pszenżyta, które odznaczały się niższym zagęszczeniem populacji *S. avenae* posiadały wyższą aktywność oksydazy polifenolowej (PPO) katalizującej przekształcanie wtórnych metabolitów fenolowych do toksycznych chinonów. Jest to jeden z elementów strategii obronnej tych roślin. Ponadto wykazała wspólnie z dr Sylwią Goławską hamującą rolę wybranych flawonoidów oraz mieszanin saponin z apigeniną na żerowanie mszycy grochowej (*Acyrtosiphon pisum* Harris).

Obecnie Dr I. Sprawka jest wykonawcą grantu NCN pt. „Ocena przydatności markerów ekspresyjnych stresu oksydacyjnego w selekcji odmian kukurydzy zwyczajnej o zróżnicowanej podatności na mszyce zbożowe” (nr. N N310 733940) . Wstępne doświadczenia na 15 odmianach kukurydzy pozwoliły wykazać, że testowane gatunki mszyc zbożowych indukowały u odmian odporniejszych silniejszy wzrost ilości transkryptów transferazy glutationowej (gst1, gst23 i gst23). Prowadzone są również analizy poziomu aktywności transkrypcyjnej genów odpowiedzialnych za biosyntezę trzech izoform katalazy (GPx, GR, DHAR) oraz peroksydazy askorbinianowej (APx) w tkankach siewek zasiedlonych przez mszyce zbożowe. Autorzy grantu planują określenie markerów ekspresyjnych stresu oksydacyjnego indukowanego żerowaniem mszyc, a także zweryfikowanie, które z wyłonionych markerów są powiązane ze stopniem podatności roślin na te fitofagi.

Dr I. Sprawka nadal kontynuuje badania nad entomotoksycznością wybranych lektyn roślinnych. Następnym obiektem jej badań jest konkanawalina A, w izolowanej z kanawalii mieczokształtnej (*Canavalia ensiformis*). Dotychczas otrzymane wyniki

wskazują, że zróżnicowane powinowactwo lektyn do komponentów sacharydowych może także wpływać na poziom ich toksyczności dla owadów. Dlatego słusznie habilitantka zauważa że dalsze badania z tego zakresu powinny koncentrować wokół dwóch zagadnień: 1) identyfikacji specyficznych dla lektyn receptorów sacharydowych w tkankach owadzych (zwłaszcza w przewodzie pokarmowym) z wykorzystaniem techniki immunohistochemicznych, 2) indukcji przez lektyny roślinne zmian w profilu ekspresji genów owadzych z zastosowaniem technik molekularnych (real-time PCR). W obrębie tego zakresu zainteresowań konieczne jednak będzie moim zdaniem uporządkowanie kierunków badań oraz ściślejsza koncentracja na tematyce badawczej z pewnością przyniesie w przyszłości dobre wyniki.

Jedynym nie roślinnym tematem badawczym w karierze naukowej Habilitantki są badania skreeningowe kleszcza pospolitego (*Ixodes ricinus* L.) środkowej i wschodniej Polski, w celu określenia skali ich zasiedlenia przez patogeniczne drobnoustroje. Badano obecność *Anaplasma phagocytophilum* (gen 16S rDNA), *Babesia microti* (gen 18S rDNA), *Bartonella henselae* (gen syntazy cytrynianowej - gltA) oraz *Borrelia burgdorferi sensu lato* (gen flagelliny - fla i gen kodujący białko ospA) w ciele kleszczy. Podwyższoną obecność *Borrelia burgdorferi sensu lato* stwierdzono na terenach zalesionych miast (parki miejskie i podmiejskie Warszawy 12,3%). Uwzględniono również zjawisko prewalencji koinfekcji badanych drobnoustrojów. Koegzystencję 2 lub 3 gatunków z rodzaju *Borrelia* potwierdzono wyłącznie w tkankach dojrzałych osobników, larwy i nimfy były gospodarzami wyłącznie pojedynczego gatunku. Badania te miały charakter użytkowy i pozwoliły oszacować stopień zagrożenia infekcjami odkleszczowymi na badanych obszarach.

III. Ocena aktywności naukowej Habilitantki

W rozumieniu rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. do oceny przedstawiony został cykl spójnych 5 publikacji pod wspólnym tematem:

Mechanizm toksycznego oddziaływania lektyny izolowanej z fasoli zwykłej (*Phaseolus vulgaris* L.) na mszycę zbożową (*Sitobion avenae* F.).

W każdej z pięciu tych publikacji oceniana jest pierwszą autorką, a jej udział nie jest mniejszy niż 70%. Cztery z tych publikacji ukazały się w czasopismach o sumarycznym wskaźniku IF = 4,02 i łącznej sumie punktów równej 104 (wg. listy MNiSW z dnia 17.12.2013). Ponadto Habilitantka opublikowała w czasopismach bazy JCR

kolejnych 9 prac. Prace te ukazały się w latach 2011-2014. Równocześnie 3 następne publikacje zostały przyjęte do druku w 2014r. Łącznie sumaryczny wskaźnik IF owych 12 prac wynosi 17,98 oraz 270 pkt. (wg. listy MNiSW). Dorobek dr Iwony Sprawki jest znaczny; sumaryczny impact factor według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 21,0 a Indeks Hirsch (WoS): 2. Według bazy Web of Science Oceniana posiada 15 cytowań. Nie jest to znaczna liczba, niemniej jest to zrozumiałe, jeśli wziąć pod uwagę fakt, iż większość Jej najwartościowszych prac ukazała się w ostatnich 4 latach. Ponadto, w Jej dorobku znajdują się 23 publikacje naukowe, z czego trzy zostały wydrukowane przed doktoratem. Kandydatka posiada jedną pracę opublikowaną samodzielnie, natomiast w siedmiu publikacjach wydrukowanych po doktoracie, jest pierwszym autorem. Jej udział w pozostałych 22 publikacjach współautorskich waha się w szerokich granicach od 10 do 80%. Łącznie, dorobek publikacyjny dr Sprawki wynosi 40 pozycji, z których tylko dwie zostały zamieszczone w czasopiśmie polskojęzycznych.

Zapoznałem się także z przedstawionymi mi do wglądu i oceny publikacjami. Zdecydowana większość opublikowanych pracy dotyczy wpływu wybranych substancji na behavior żerowania mszyc. W szczególności gatunków powszechnie uważanym za szkodliwe w uprawie zbóż: *Sitobion avenae* (F.) i *Rhopalosiphum padi* L. Wątek ten stanowi główny nurt badawczy kandydatki. Mniej liczne są prace dotyczące zawartości określonych biokomponentów w konkretnym gatunku rośliny i ich wpływu na żerowanie mszyc. Pozostałe publikacje obejmują tematykę pokrewną. Zatem zakres zainteresowań badawczych Habilitantki widzę, jako wyraźnie skoncentrowany na określonej tematyce badawczej. Na uwagę zasługuje staranny dobór piśmiennictwa w publikacjach, dowodzący dobrej znajomości najnowszej problematyki, a przede wszystkim dobrze rozwinięty warsztat technik badawczych. Habilitantka przywiązuje dużą wagę do stałego podnoszenia swoich kwalifikacji w tym zakresie. Wielokrotnie uczestniczyła w kursach i szkoleniach z zakresu metod biologii molekularnej. Były to między innymi: Elektroforetyczne metody analizy białek, Immunodetekcja białek, oraz różnorodne zastosowania technik PCR (*RT-PCR i PCR-RFLP w diagnostyce, real-time PCR, QPCR Day*, czy bezpośrednie sekwencjonowanie produktu PCR).

Po zapoznaniu się z badaniami Habilitantki zawartymi w przedstawionych mi pracach uważam, że zawarty w nich materiał badawczy jest obszerny i interesujący zarówno z poznawczego jak i praktycznego punktu widzenia.

IV. Ocena dorobku dydaktycznego, popularyzatorskiego i współpracy międzynarodowej

Dr I. Sprawka jest wszechstronnym dydaktykiem. Prowadziła zajęcia na kierunkach biologia; bioinżynieria produkcji żywności; chemia i zootechnika. Była też autorką lub współautorką programów ćwiczeń: Biochemia ogólna, Biochemia z elementami biofizyki, Biochemii zwierząt, Biochemii ogólnej i żywności, Biologia molekularna, Bioinformatyka, Diagnostyka molekularna, Metody badawcze w biologii molekularnej; Technologie biochemiczne. Prowadziła seminaria licencjackie i magisterskie. Była również współautorem programu wykładów i ćwiczeń z przedmiotu - Biotechnologia, realizowanego na studiach podyplomowych. Habilitantka była promotorem 3 prac licencjackich oraz mentorem naukowym ponad 20 magistrantów.

Habilitantka wykazywała aktywność w popularyzacji wyników swoich dotychczasowych badań. Prezentowała je, jako autorka lub współautorka referatów uczestnicząc w 6 konferencjach krajowych, oraz 39 posterów w tym także na konferencjach międzynarodowych. Sama również brała udział w organizacji 2 krajowych konferencji naukowych.

Dr Iwona Sprawka jest wykonawcą 1 projektu grantowego NCN (N N310 733940: realizacja 2011-2014). Jest autorką 6 recenzji wykonanych dla anglojęzycznych redakcji czasopism naukowych takich jak: Applied Biochemistry and Biotechnology, Crop Protection, Insect Science czy Journal of Insect Physiology. Bierze udział w pracach Polskiego Towarzystwa Entomologicznego oraz Japanese Society of Applied Entomology and Zoology.

Szkoda jednak, że Habilitantka nie miała okazji odbyć żadnych staży w zagranicznych placówkach naukowych. Była natomiast uczestnikiem International EPG Workshop/ Training Course organizowanym przez Uniwersytet Zielonogórski (co może być traktowane, jako staż krótkoterminowy). Była trzykrotnie nagradzana przez Rektora Akademii Podlaskiej. Habilitantka nie wykazała też w dokumentacji publikacji o charakterze popularyzatorskim, posiada natomiast niewątpliwe osiągnięcia dydaktyczne nie zmienia to zatem mojej oceny Jej dorobku jako całości.

V. Wniosek końcowy

W świetle przedstawionej oceny dorobku naukowego, dydaktyczno-popularyzatorskiego i organizacyjnego dr Iwony Sprawki uważam, że osiągnięcia Pani doktor w zakresie dorobku naukowego spełniają kryteria określone w ustawie z

dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595, z późniejszymi zmianami) a także w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie kryterium oceny osiągnięć osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego z dnia 1 września 2011 roku. W związku z powyższy popieram wniosek o nadanie dr Iwonie Sprawce, stopnia doktora habilitowanego i wnoszę o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.



Dr hab. inż. Zdzisław Klukowski, prof. UP.