

Recenzja osiągnięć dr Iwony Sprawki ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauki biologiczne dyscyplinie biologia

1. Najważniejsze fakty z życiorysu zawodowego Kandydatki

Dr Iwona Sprawka, dr nauk biologicznych w dyscyplinie biologia jest absolwentką Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie (1989), uzyskując tam stopień magistra biologii – specjalność biologia molekularna. W okresie 1989 – 1990 była zatrudniona na etacie asystenta w Katedrze Biochemii Klinicznej i Toksykologii Środowiska Akademii Medycznej w Lublinie. W latach 1990 – 1993 przebywała na urlopie wychowawczym. Od 1993 r. jest związana z obecnym Uniwersytetem Przyrodniczo-Humanistycznym w Siedlcach, rozpoczynając pracę naukowo-dydaktyczną na stanowisku asystenta w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej w ówczesnej Wyższej Szkole Rolniczo-Pedagogicznej w Siedlcach. Trafiła do zespołu aktywnych badaczy, stworzonym przez prof. dr Seweryna Niraza, już wtedy o uznanym dorobku europejskim, przede wszystkim dzięki wieloletnim badaniom zainicjowanych przez prof. dr Bogumiła Leszczyńskiego nad biochemicznymi i fizjologicznymi powiązaniem pomiędzy mszycami zbożowymi a wybranymi gatunkami zbóż, w celu określenia biochemicznych, fizjologicznych i molekularnych mechanizmów warunkujących różnice w podatności odmianowej zbóż na mszyce.

W 2001 r. mgr. I. Sprawka uzyskała stopień doktora, przedstawiając Radzie Wydziału Rolniczego, Akademii Podlaskiej w Siedlcach, pracę doktorską – „Zmiany w zawartości i składzie aminokwasowym białek pszenżyta ozimego wywołane żerowaniem mszycy zbożowej (*Sitobion avenae* [F.]), wykonaną pod kierunkiem prof. dr. Antoniego P. Ciepieli. W okresie 2001 – 2013 zatrudniona była na stanowisku adiunkta w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej, Wydziału Przyrodniczego, Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach, a od 1 października 2013 r. kontynuuje pracę na stanowisku starszego wykładowcy w tej samej katedrze.

Oceniając dorobek naukowy dr I. Sprawki należy podkreślić, że od 1993 r. pracuje w dynamicznie rozwijającym się naukowo zespole młodych wtedy naukowców. Zespół ten jako jeden z pierwszych w świecie zwrócił uwagę na znaczenie umiarkowanego poziomu odporności roślin na szkodniki i konieczność poznania mechanizmów, warunkujących odporność u różnych gatunków zbóż na mszyce. Należy pamiętać, że w tamtym okresie uwaga naukowców i ich cel badań był skupiony na mechanizmach warunkujących wysoki poziom odporności, najczęściej warunkowany zależnościami gen-gen i z reguły jedną biochemiczną, fizjologiczną a czasami i anatomiczną cechą odpornych roślin. Jednak ten typ odporności odmianowej roślin po kilku latach z reguły był „przełamany” przez odporną populację szkodnika.

2. Ocena osiągnięcia naukowego wymienionego w Art. 16 Ustawy (znowelizowanej w 2011 r.) oraz pozostałego opublikowanego dorobku naukowego.

Dr I. Sprawka przedstawiła swoje osiągnięcie naukowe w formie 5 publikacji pod łącznym tytułem „Mechanizm toksycznego oddziaływania lektyny izolowanej z fasoli zwykłej (*Phaseolus vulgaris* L.) na mszycę zbożową (*Sitobion avenae* [F.]). Wszystkie te publikacje dotyczą mechanizmów działania lektyn na zachowania związane z żerowaniem i ich wpływ na różne parametry biologii mszycy zbożowej. Podjęcie przez I. Sprawkę badań nad tymi białkami pokryło się z rosnącym zainteresowaniem tą grupą białek roślinnych jako ważnych

czynników o potencjalnym wykorzystaniu w biotechnologii, stwarzającej możliwości wprowadzenia genów kodujących toksyczne biomolekuły do genomów roślinnych, dla uzyskania roślin odpornych na wybrane gatunki szkodników. W dobrze przygotowanym i aktualnym przeglądzie literatury swoich prac I. Sprawka charakteryzuje występowanie w roślinach i biologiczne właściwości tych białek w roślinach i ich oddziaływanie na organizmy zwierzęce, w tym szkodniki roślin. Lekтины wykazują zdolność do specyficznego rozpoznania i odwracalnego wiązania wolnych lub związanych ligandów cukrowych o charakterze mono- lub oligosacharydów. Dotychczas wyizolowano i scharakteryzowano ponad 200 lektyn roślinnych, które charakteryzują się dużym zróżnicowaniem pod względem budowy, powinowactwa do komponentów sacharydowych oraz lokalizacji w organach i tkankach. Bogatym źródłem lektyn są przede wszystkim nasiona roślin bobowatych i traw. Słusznie Autorka zaznacza, że mimo powszechnego występowania tych białek, fizjologiczna rola lektyn w tkankach roślinnych jest wciąż słabo poznana. Dotychczasowe badania wskazują, że lektyny roślinne uczestniczą w różnego rodzaju procesach „rozpoznawczych”, których skutkiem jest przekazywanie sygnałów strategicznych dla zapoczątkowania, podtrzymania lub wygaszania procesów metabolicznych. Procesy te są oparte na zdolności lektyn do rozpoznania i wiązania cukrowców i warunkują one odbieranie i selekcjonowanie sygnałów spoza komórki. Dane literatury wskazują, że lektyny są syntetyzowane w odpowiedzi na określone bodźce pochodzenia zewnętrznego jak: susza, oziębienie, zasolenie, zranienie, infekcja patogenami w tkankach lub komórkach bezpośrednio na nie narażonych. Stwierdzono również, że białka te są cząsteczkami sygnałnymi syntetyzowanymi w roślinach w odpowiedzi na atak roślinożernych owadów, co wskazuje, że są one jednym ze składników mechanizmów obronnych wykształconych przez rośliny na drodze ewolucji. Wykazano, że białka te negatywnie oddziałują na różne gatunki owadów z rzędu Coleoptera, Hemiptera, Diptera i Lepidoptera. Mimo potwierdzonej owadobójczej aktywności lektyn roślinnych, mechanizm ich insektycydalnego oddziaływania nie jest poznany i w pełni wyjaśniony. Podstawowym czynnikiem warunkującym ich toksyczność dla owadów jest ich zdolność do przyłączania się do ugrupowań/receptorów sacharydowych obecnych w owadzie glikoproteinach lub glikolipidach zlokalizowanych na powierzchni komórek/organów. Prowadzi to do zaburzeń natury morfologicznej, powodując w konsekwencji zmiany w metabolizmie i funkcji poszczególnych organów owadów. Sformułowano także hipotezę, która zakłada, że poszczególne lektyny roślinne mogą charakteryzować się różnymi mechanizmami owadobójczego działania, co może wynikać z ich zróżnicowanej zdolności do rozpoznawania i przyłączania się do specyficznych dla danej lektyny ligandów sacharydowych. W podsumowaniu można stwierdzić, że w piśmiennictwie z zakresu interakcji lektyny roślinne – fitofagi, niewiele jest prac naukowych dotyczących wyjaśnienia mechanizmu ich entomotoksycznych właściwości. Jak zaznacza Autorka, było to podstawą do podjęcia przez nią problematyki badawczej nad poznaniem mechanizmów interakcji pomiędzy fitohemaglutyniną i fitofagą *Sitobion avenae* jako ważnego szkodnika zbóż.

W prezentowanych publikacjach Autorka zawarła wyniki swoich badań nad następującymi powiązaniemami pomiędzy różnymi białkami a mszycą zbożową:

- (a) wpływu różnych białek na przeżywalność mszycy zbożowej;
- (b) potencjalnego oddziaływania lektyny izolowanej z fasoli zwykłej (fitohemaglutyniny, PHA) na bionomię i parametry populacyjne mszycy zbożowej;
- (c) wpływu lektyny na zachowanie mszycy zbożowej związanej z żerowaniem;
- (d) oddziaływania fitohemaglutyniny na aktywność enzymów mszycy zbożowej uczestniczących w przyswajaniu cukrowców i białek, metabolizmie fosforu oraz w detoksyfikacji związków toksycznych (α - i β -glukozydazy, kwaśnej i alkalicznej fosfatazy, aminopeptydazy leucynowej, katepsyny L) i

- (e) zbadane indukcji zmian w komórkach przewodu pokarmowego mszycy zbożowej pod wpływem fitohemaglutyniny.

W publikacji „Effect of some proteins on biology of grain aphid (*Sitobion avenae* [F.]) (Pestycydy/Pesticides 2007, vol. 3-4: 45-51) wprowadzając do standardowej sztucznej pożywki takie białka jak: bromelainę, lizozym, jad pszczeły, konkanawalinę i lektynę zarodka pszenicy i badając w warunkach *in vitro* ich wpływ na wybrane parametry bionomiczne Autorka wykazała:

- (i) pomimo, że nie obserwowano ujemnego działania testowanych białek na akceptację pokarmu w czasie pierwszej godziny ich żerowania, to po 48 godz. działanie deterentne wykazały wszystkie badane białka, najsilniejsze w przypadku konkanawaliny i lektyny zarodków pszenicy zawartej w pożywce mszyc, w warunkach testu wyboru pokarmu;
- (ii) istotne ograniczenie przyswojonego pokarmu w obecności konkanawaliny i lektyny zarodków pszenicy w pożywce mszyc;
- (iii) ograniczanie w największym stopniu przez te białka przeżywalności badanych mszyc.

Pogłębione badania nad obserwowanym w poprzednim doświadczeniu wpływem białek na zachowanie mszycy zbożowej związanej z jej żerowaniem zamieszczono w zbiorowej publikacji „Effect of the lectin PHA on the feeding behavior of the grain aphid” (Journal of Pest Science, 2010, vol. 83: 149-155). Biorąc pod uwagę dane literaturowe o potencjalnych zdolnościach lektyn do przyłączania się do glikozydowych białek receptorowych sensilli smakowych zlokalizowanych w błonach otworu gębowego owadów blokując ich dostępność dla sygnałów chemicznych związków smakowych, autorzy wykorzystując elektroniczne techniki DC EPG (ang. electronic penetration graphs) monitorowania penetracji i pobierania pokarmu przez mszycę zbożową wykazali:

- (i) dodanie fitohemaglutyniny do żeli agarowo-sacharozowych powodowało redukcję aktywności sztyletów mszyc w żelu a także wydłużenie czasu tej aktywności (C model EPG);
- (ii) lektyna PHA indukowała także redukcję aktywności związanej z wydzielaniem śliny (E1 model EPG) oraz aktywności związanej z pobieraniem pokarmu (E2 model EPG), a przy wyższych stężeniach całkowicie hamowała powyższe aktywności;
- (iii) analiza zarejestrowanych modeli EPG wykazała, że lektyna PHA skracała czas pierwszego modelu E1 i E2;
- (iv) podobne zależności zarejestrowano dla aktywności mszyc związanej z aktywnym pobieraniem fluidu (G model EPG). Wyższe stężenia powodowały redukcję tej aktywności oraz indukowały skrócenie czasu trwania pierwszego G modelu EPG a także redukcję całkowitego czasu trwania modelu G.

W kolejnych doświadczeniach zaobserwowany istotny wpływ 4 różnych stężeń fitohemaglutyniny w sztucznych pożywkach na wybrane parametry rozwoju populacji mszycy zbożowej odniesiono do jej interakcji z enzymami mszycy, które mogą prowadzić do zaburzeń w ich funkcjonowaniu. Wybrano enzymy przewodu pokarmowego mszyc uczestniczące w przyswajaniu cukrowców i białek, metabolizmie fosforu oraz w detoksykacji allelozwiązków. Opublikowane wyniki w pracy zbiorowej; „Insecticidal action of phytohemagglutinin (PHA) against the grain aphid, *Sitobion avenae*” (Pesticide Biochemistry and Physiology, 2011, vol. 100: 64-69) wskazują, że:

- (i) testowana lektyna proporcjonalnie do jej stężenia w pożywce powodowała spadek aktywności α -glukozydazy oraz fosfatazy alkalicznej w tkankach mszycy;

- (ii) niższe stężenia fitohemaglutyniny wywoływały wzrost aktywności β -glukozydazy oraz fosfatazy kwaśnej, natomiast wyższe stężenia powodowały spadek aktywności tych enzymów w tkankach żerujących mszyc;
- (iii) testowana lektyna stymulowała aktywność katepsyny L, wpływając jednocześnie na spadek aktywności drugiej z badanych proteaz – aminopeptydazy N.

W dwóch następnych publikacjach „Antimetabolic effect of phytohemagglutinin to the grain aphid *Sitobion avenae* Fabricus” (Acta Biologica Hungarica, 2012, vol. 63 [3]: 342-353) i “Induction of apoptosis in the grain aphid *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae) under the influence of phytohemagglutinin PHA” (Appl. Entomol. Zool, 2013, vol. 48: 525-532) odniesiono się do publikacji innych autorów wskazujących, że komórki i tkanki przewodu pokarmowego owadów są głównym miejscem przyłączania się lektyn roślinnych. Lektyny wiążąc się z częścią cukrową glikoprotein lub glikolipidów znajdujących się na powierzchni komórki mogą prowadzić do aktywacji oraz transdukcji procesu apoptozy i tym samym stanowić jeden z czynników leżących u podstaw toksyczności tych białek. I. Sprawka wraz ze współpracownikami wykazali, że:

- (i) komórki nabłonka jelitowego mszyc żerujących na pożywkach zawierających fitohemaglutyninę odznaczały się podstawowymi cechami apoptotycznych komórek;
- (ii) komórki te charakteryzowały się tzw. „drabinkowym” obrazem DNA w otrzymanych elektroferogramach;
- (iii) wykazano indukcję kaspazy 3, kluczowego enzymu (kaspaza wykonawcza) uczestniczącego w szlaku apoptozy.

W podsumowaniu wyników badań przedstawionych w publikacjach do opinii pragnę podkreślić znaczenie podjętych badań nad mechanizmami powiązań pomiędzy lektynami roślinnymi a szkodnikami i możliwościami wykorzystania ich w hodowli odpornościowej, których opisów nie znajdziemy w podstawowych podręcznikach o odporności roślin na szkodniki (Z.T. Dąbrowski, 1988 czy C.M. Smith, 1989). Dr I. Sprawka umiejętnie wykorzystywała różne technik i metody badawcze w badaniach nad behawioralnymi, fizjologicznymi i biochemicznymi powiązaniem pomiędzy lektynami a mszycą zbożową. Jako entomolog muszę podkreślić poprawną metodykę stosowaną w opracowaniu parametrów rozwoju populacji mszycy zbożowej i w badaniach nad analizą zachowania mszyc związanym z procesem akceptacji i kontynuowania żerowania przy pomocy metody elektronicznego rejestrowania reakcji owadów. Większość referowanych badań wykonała we współpracy z innymi specjalistami, co wskazuje na jej umiejętność pracy zespołowej, której brakuje wielu badaczom w Polsce. Prace te są ważnym wkładem w poznaniu oddziaływania fitohemaglutyniny na parametry populacyjne i fizjologię mszycy zbożowej. Wzbogacają one naszą wiedzę o mechanizmy odporności roślin na szkodniki i ich możliwości wykorzystania w nowoczesnych metodach genetycznych modyfikacji roślin.

W ocenie parametrycznej publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego to 104 punkty wg. listy MNiSW a impact factor IF - 4,024.

3. Ocena istotnej aktywności badawczej, współpracy międzynarodowej, dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego habilitantki.

Jak poprzednio zaznaczyłem, I. Sprawka podejmując pracę w 1993 r. w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej ówczesnej Wyższej Szkole Rolniczo-Pedagogicznej w Siedlcach trafiła do zespołu już o uznanym europejskim dorobku, licznych kontaktach zagranicznych z uznanymi ośrodkami naukowymi w Europie i USA. Problematyką przewodnią było poznanie

biochemicznych i fizjologicznych powiązań pomiędzy mszycami zbożowymi a różnymi gatunkami i odmianami zbóż. Początkowe jej badania skupiały się na wyjaśnieniu różnic w zawartości różnych składników pokarmowych mszyc w umiarkowanej odmianowej odporności *Triticale* i pszenicy na różne gatunki mszyc zbożowych. Jednocześnie badała oddziaływanie wybranych flawonoidów i saponin na różne etapy mechanizmu akceptacji i intensywności żerowania mszycy grochowiej (*Acyrtosiphon pisum* Hareris). O dużej aktywności badawczej dr I. Sprawki wskazuje liczba prac opublikowanych na różnych etapach jej rozwoju naukowego:

- (i) 3 recenzowane prace w j. angielskim o fizjologicznych i biochemicznych powiązaniach odmian *Triticale* i mszycami zbożowymi (12 punktów wg. MNiSW) przed uzyskaniem stopnia doktora;
- (ii) po uzyskaniu stopnia doktora - 12 prac opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC) stanowiących 270 punktów wg. punktacji MNiSW i impact factor (IF) - 17,983;
- (iii) 20 innych publikacji w czasopismach recenzowanych – 106 punktów (MNiSW)

Prace dr I. Sprawki przyczyniły się do ugruntowania europejskiej pozycji Katedry Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach w badaniach nad odpornością zbóż na mszyce ale i podstawowych biochemicznych, fizjologicznych i obecnie molekularnych związków pomiędzy roślinami a fitofagami.

Pragnę zwrócić uwagę na otwartość na nowe wyzwania i problematykę badawczą dr I. Sprawki. W latach 2007-2009 wspólnie z dr Hubertem Sytykiewiczem prowadziła badania nad częstotliwością występowania wybranych mikroorganizmów patogennych dla człowieka w tkankach kleszcza pospolitego (*Ixodes ricinus* L.) na obszarze środkowej i wschodniej Polski. W celu detekcji gDNA patogennych drobnoustrojów wykorzystwała techniki PCR oraz *nested*-PCR. Ważnym ze względów społecznych było stwierdzenie, że najwyższą prevalencję koinfekcji *Anaplasma phagocytophilum* i *Babesia microti* stwierdzono w tkankach kleszczy odłowionych w parkach miejskich w Warszawie i terenach podmiejskich (odpowiednio 3,3 i 4,8%), a DNA *Borrelia burgdorferi* u 12,3% kleszczy na terenie zalesionych okolic Warszawy.

Obecnie jest wykonawcą w projekcie pt. „Ocena przydatności markerów ekspresyjnych stresu oksydacyjnego w selekcji odmian kukurydzy zwyczajnej o zróżnicowanej podatności na mszyce zbożowe” (2011-2014; nr. N N310 733940) finansowanym przez NCN w Krakowie. Jest również wykonawcą w projekcie badań statutowych Katedry Biochemii i Biologii Molekularnej UPH – „Poszukiwanie naturalnych biopestycydów”, tematyce pokrywającej się z tendencjami wprowadzania pro-ekologicznych metod ochrony roślin w Europie.

Osiągnięcia dydaktyczne

Dr I. Sprawka prowadziła pracownię licencjacką i magisterską dla studentów kierunku Biologia. Opracowała program ćwiczeń oraz metodyki do ich prowadzenia z przedmiotów: „Biologia molekularna”, „Metody badawcze w biologii molekularnej”, „Diagnostyka molekularna”, „Bioinformatyka” dla studentów kierunku Biologia oraz „Technologie biochemiczne” dla kierunku Bioinżynieria Produkcji Żywności. Opracowała program i prowadzi wykłady z przedmiotu „Biologia molekularna” od 2006 r. Jest współautorem programu wykładów i ćwiczeń z przedmiotu „Biotechnologia”, realizowany na studiach podyplomowych „Biologia z ochroną środowiska”. Powadziła też zajęcia na innych kierunkach jak Chemia, Zootechnika, Dietetyka.

Była opiekunem naukowym 20 studentów piszących prace magisterskie, promotorem 3 prac licencjackich i recenzentem licznych prac dyplomowych.

4. Wniosek końcowy

Dorobek naukowy dr Iwony Sprawki przedstawiony w licznych publikacjach w j. angielskim w recenzowanych czasopismach, w tym z „*impact factor*” i 34 referatach i posterach podczas krajowych i międzynarodowych konferencji i sympozjach świadczy o jej wysokiej aktywności jako dojrzałego badacza. Przedstawione publikacje wchodzące w skład osiągnięci naukowego „Mechanizm toksycznego oddziaływania lektyny izolowanej z fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris* L.) na mszycę zbożową (*Sitobion avenae* [F.])” wnoszą nowe informacje dotyczące podstawowych biochemicznych i fizjologicznych interakcji pomiędzy lektynami a szkodnikami. Zastosowane przez nią techniki i metody badawcze wymagały wiedzy z różnych dziedzin jak: entomologia, zoologia a przede wszystkim biochemii i fizjologii roślin. Zastosowana metodyka wszystkich tych badań była prawidłowa, o czym świadczy przyjęcie przygotowanych publikacji do renomowanych czasopism, w tym zagranicznych. Uzyskane wyniki badań dr I. Sprawki wnoszą też istotny wkład w poznaniu mechanizmów działania lektyn roślinnych na fitofagi i możliwości wykorzystania tych mechanizmów przy genetycznej modyfikacji roślin w celu uzyskania odpornych odmian. Należy zaznaczyć, że dotychczasowe wykorzystanie genów *cry* pochodzących z bakterii *Bacillus thuringiensis* warunkują tylko odporność zmodyfikowanych roślin na wybrane gatunki z rzędu Lepidoptera (toksyna Cry 1 Ab) i Coleoptera (Cry 3), a nie działają na owady o aparacie kłująco-ssącym (Hemiptera).

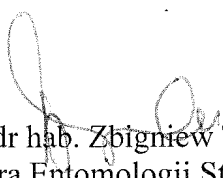
W ocenie parametrycznej udokumentowany dorobek naukowy dr I. Sprawki wynosi:

- (i) sumaryczny impact factor wg. listy Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania – 21,007;
- (ii) liczba cytowań publikacji wg. bazy Web of Science – 15;
- (iii) indeks Hirscha wg. bazy Web of Science – 2.

Planowane dalsze badania wskazują na otwartość dr I. Sprawki i gotowość do kontynuowania badań i pokrywają się z tendencjami nauki światowej dotyczącą:

- (i) identyfikacji specyficznych dla lektyn receptorów sacharydowych w tkankach owadów (zwłaszcza w przewodzie pokarmowym) z wykorzystaniem technik immunohistochemicznych i
- (ii) indukcji przez lektyny roślinne zmian w profilu ekspresji genów owadów z zastosowaniem technik molekularnych (*real-time* PCR)

Z pełnym przekonaniem stawiam wniosek do Rady Wydziału Geograficzno-Biologicznego Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie o dopuszczenie dr Iwony Sprawki do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.


Prof. dr hab. Zbigniew T. Dąbrowski
Katedra Entomologii Stosowanej SGGW

Warszawa, 20 czerwca 2014 r.