

Ocena pracy doktorskiej mgr Beaty Wielkopolan pt. „Mechanizmy obronne pszenicy zwyczajnej na żerowanie skrzypionek (*Oulema* spp.)”

Skrzypionki *Oulema* spp. są groźnymi szkodnikami zbóż, przede wszystkim pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.) i jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.). W ostatnich dekadach występowanie tych szkodników nasila się w Polsce, a ich zagrożenie dla zbóż jest związane z żerowaniem zarówno form larwalnych jak i osobników dorosłych. W badaniach dotyczących tych szkodników przeważają prace nad biologią i określaniem ich szkodliwości. Brak jest natomiast prac nad roślinnymi mechanizmami obronnymi oraz biochemicznymi mechanizmami adaptacyjnymi skrzypionek do ich roślinnych żywicieli. Stąd podjęcie takiego zagadnienia w badaniach mgr Beaty Wielkopolan uważam za w pełni zasadne.

Przedmiotem postępowania w przewodzie doktorskim mgr Beaty Wielkopolan jest rozprawa doktorska, w postaci monotematycznego, cyklu 5 publikacji naukowych pod wspólnym tytułem „Mechanizmy obronne pszenicy zwyczajnej na żerowanie skrzypionek (*Oulema* spp.)”, składającego się z artykułu przeglądowego naukowego i 4 artykułów oryginalnych, opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych:

- 1) Wielkopolan B., Obrępańska-Stęplowska A. 2016. Three-way interaction among plants, bacteria, and coleopteran insects. *Planta*, **244**, 313-332. (artykuł przeglądowy) <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2543-1> IF = 3,239; MNiSW₂₀₁₆-40pkt
- 2) Wielkopolan B., Walczak F., Podleśny A., Nawrot L., Obrępańska-Stęplowska A. 2015. Identification and partial characterization of proteases in larval preparations of the cereal leaf beetle (*Oulema melanopus*, Chrysomelidae, Coleoptera). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **88(3)**: 192-202. <https://doi.org/10.102/arch.21223>. Epub 2015 Jan 12. PMID: 25580929 IF = 1,160; MNiSW₂₀₁₅-20pkt
- 3) Wielkopolan B., Krawczyk K., Obrępańska-Stęplowska A. 2018. Gene expression of serine and cysteine proteinase inhibitors during cereal leaf beetle larvae feeding on wheat: the role of insect-associated microorganisms. *Arthropod-Plant Interactions*, **12**: 601-612. <https://doi.org/10.107/s11829-018-9608-y> IF = 1,63; MNiSW₂₀₁₈-30pkt

- 4) Wielkopolan B., Krawczyk K., Szabelska-Beręsewicz A., Obrępańska-Stęplowska A. 2021. The structure of the cereal leaf beetle (*Oulema melanopus*) microbiome depends on the insect's developmental stage, host-plant, and origin. *Scientific Reports*, **11**: 20496. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99411-9>
IF = 4,379; MNiSW₂₀₂₁-140pkt
- 5) Wielkopolan B., Frąckowiak P., Wieczorek P., Obrępańska-Stęplowska A. 2022. The impact of *Oulema melanopus* - associated bacteria on the wheat defense response to the feeding of their insect hosts. *Cells*, **11(15)**: 2342.
<https://doi.org/10.3390/cells11152342> IF = 7,666; MNiSW₂₀₂₂-140pkt

Wszystkie prace są współautorskie, w których mgr Beata Wielkopolan jest pierwszym autorem. Do załączonych prac oryginalnych opracowała hipotezy badawcze, koncepcje badań, zaplanowała i wykonała eksperymenty, dokonała interpretacji wyników oraz przygotowała teksty do druku, a Jej udział w przedstawionych do oceny publikacjach, co wynika z załączonych oświadczeń współautorów, wynosi odpowiednio: 60, 56, 65, 50 i 50 procent. Łączny Impact Factor = 18,074, a sumaryczna liczba punktów wg MNiSW, zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 370 pkt. Na podkreślenie zasługuje fakt, że prace opublikowane w latach 2015-2022 były już 64 razy cytowane.

Celem prezentowanego cyklu publikacji było zweryfikowanie założonej hipotezy badawczej, w myśl której pod wpływem żerowania owada, w tkankach pszenicy następuje indukcja ekspresji genów kodujących inhibitory proteaz szkodnika, jednak biochemiczne adaptacje skrzypionek, w połączeniu z bakteriami związanymi z *Oulema melanopus* zmieniają ten stan interakcji roślinny żywiciel-szkodnik na korzyść szkodnika.

W kolejnych pracach cyklu (w kolejności wykazanej w rozprawie) Autorka przedstawiła następujące zagadnienia:

W pierwszym artykule przeglądowym, z roku 2016, ogólną charakterystykę trójtroficznych interakcji roślina-szkodnik-bakterie. Szczególną uwagę zwrócono na szkodliwe owady roślinożerne z rzędu Coleoptera, przedstawiono ich mechanizmy żerowania oraz zmiany w aktywności enzymów trawiennych (z udziałem bakterii), jako wyraz adaptacji biochemicznych do roślinnych mechanizmów obronnych. Praca ta pokazuje dobre przygotowanie literaturowe doktorantki do przeprowadzenia zaplanowanych badań, w oparciu o bardzo szeroką literaturę naukową związaną z badanym zagadnieniem.

W drugim artykule, z roku 2015, enzymy proteolityczne skrzypionek, należące do: proteaz cysteinowych, proteaz serynowych (trypsyna i chymotrypsyna), proteaz aspartylowych (katepsyna D) oraz metaloproteaz. Ponadto, po potraktowaniu larw skrzypionek selektywnymi inhibitorami proteaz stwierdziła, że mogą one łagodzić ich działanie poprzez wyższą aktywność proteaz niewrażliwych, wyższą aktywność niektórych izoform, a nawet

biosyntezę dodatkowych izoform proteaz. W prezentowanej pracy godny podkreślenia jest dobry warsztat biochemiczny doktorantki.

W trzecim artykule, z roku 2018, mechanizmy reakcji obronnych pszenicy jarej (1 odmiana) i ozimej (2 odmiany), związane z ekspresją genów kodujących inhibitory proteaz cysteinowych i serynowych, z uwzględnieniem roli bakterii zasocjowanych z owadem. W tkankach liści uszkodzonych przez owady stwierdzono znacznie wyższy poziom ekspresji genu kodującego inhibitor proteazy serynowej niż cysteinowej. Wykazano także, iż poziom ten był odmianowo-specyficzny oraz zależny od naturalnej mikroflory bakteryjnej w przewodzie pokarmowym owadów. Z uwagi na odmianową specyficzność szkoda, że badania te nie zostały przeprowadzone na bardziej reprezentatywnym materiale roślinnym. Z innych czynników mających wpływ na badane interakcje, o których wspomina Autorka, warto w przyszłości przebadać, w tym kontekście, powszechnie znane allelozwiązki (ksenobiotyki) pszenicy takie jak: kwasy hydroksamowe czy związki fenolowe.

W czwartym artykule, z roku 2021, charakterystykę mikrobiomu bakteryjnego skrzypionek. W Top Biome skrzypionek występuje 10 rodzajów oraz 6 gatunków bakterii, a w określonym mikrobiomie podstawowym skrzypionek 2 rodzaje bakterii: *Rickettsia* i *Wolbachia*. Stwierdzono, że liczebność względna poszczególnych rodzajów i gatunków bakterii z Top Biome zależała od stadium rozwojowego skrzypionki oraz od rośliny żywicielskiej. Przy czym, największą bioróżnorodność bakterii stwierdzono u owadów występujących na jęczmieniu i pszenicy jarej.

W piątym artykule, z roku 2022, odpowiedź pszenicy na uszkodzenia mechaniczne oraz żerowanie larw skrzypionki zbożowej, z uwzględnieniem wpływu bakterii związanych z tym szkodnikiem. Stwierdzono wyraźne zmiany w ekspresji genów związanych m.in. z fotosyntezą, stresem oksydacyjnym, szlakami sygnałowymi, metabolizmem podstawowym i wtórnym w tkankach liści uszkodzonych. Bakterie współdziałające ze skrzypionkami supresowały ekspresję genów, szkodliwych dla owada metabolitów roślinnych. A także odwracały kierunek ekspresji niektórych genów odpowiedzialnych m.in. za fotosyntezę, stres oksydacyjny, biogenezę ściany komórkowej czy ufosforylowanie białek.

Poszczególne elementy rozprawy zostały poddane merytorycznej ocenie przez kompetentnych recenzentów i przedstawione przez w/w czasopisma naukowe do szerokiej weryfikacji środowiska naukowego, na co wskazują cytowania przedstawionych prac. Dlatego ograniczę się tylko do oceny całości rozprawy. Najpierw chciałbym podkreślić, że stanowi ona przykład dobrze przemyślanego, popartego gruntowną znajomością *backgroundu* badanego zagadnienia; poprawnie zaplanowanego i wykonanego projektu badawczego. Jest interesującym studium oddziaływania środowiskowego czynnika biotycznego (skrzypionka), wspomaganego przez inny czynnik biotyczny (bakterie) na roślinę żywicielską oraz towarzyszących temu interakcji na poziomie molekularnym. Umiejętność

połączenia tych oddziaływań w prezentowanym projekcie badawczym niewątpliwie zasługuje na uznanie. Autorka przedstawionej do oceny rozprawy słusznie konkluduje, iż na kompleksowość biochemicznych interakcji pszenica-skrzypionka zbożowa duży wpływ wywiera mikrobiom szkodnika. Dlatego przedstawione wyniki stawiają badanie mechanizmów tych interakcji w nowym świetle i stanowią cenny wkład do nauki w tym zakresie.

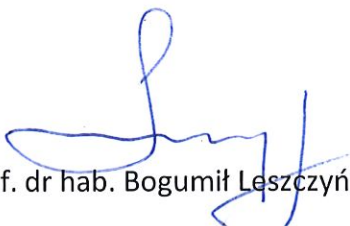
Na zakończenie chciałbym podkreślić ogrom pracy Doktorantki oraz budzącą podziw umiejętność wykorzystania zaawansowanych technik badawczych z bardzo różnych obszarów nauk przyrodniczych. Ponadto, na uwagę zasługuje również udział Doktorantki, w dwóch grantach z NCN (2011/03/B/NZ9/01598 i 2016/23/B/NZ9/03503), w których była głównym wykonawcą. Reasumując, z analizowanego materiału wynika, że Doktorantka jest dobrze przygotowana do pracy naukowej co dobrze rokuje w Jej dalszej aktywności naukowej.

Wniosek końcowy

Przedstawiony cykl monotematycznych publikacji naukowych spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i w mojej opinii zasługuje na bardzo wysoką ocenę. Dlatego z pełnym przekonaniem wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Ochrony Roślin Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Beaty Wielkopolan do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na nowatorskość projektu naukowego, włożony w jego realizację ogrom pracy Doktorantki oraz opanowanie i umiejętne posługiwanie się zaawansowanymi metodami badawczymi, z różnych obszarów nauk przyrodniczych wnoszę, jeżeli jest to możliwe, o wyróżnienie przedstawionej rozprawy doktorskiej.

Siedlce, 26 października 2022r.


Prof. dr hab. Bogumił Leszczyński