

Prof. dr hab. Stanisław Weidner
Ul. J. Iwaszkiewicza 41/3
10-089 Olsztyn

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

Podstawą formalną wykonania recenzji jest pismo Sekretarza Rady Naukowej Instytutu Ochrony Roślin – PIB w Poznaniu z dnia 20.10.2022r. powierzające mi obowiązki recenzenta w/w rozprawy doktorskiej na podstawie uchwały Rady Naukowej Instytutu Ochrony Roślin – PIB w Poznaniu.

Praca doktorska mgr Beaty Wielkopolan jest wykonana według nowych standardów i cechuje się niezwykle starannością edytorską. Składa się z czterech oryginalnych publikacji i jednej przeglądowej oraz dość obszernej części opisowej, zawierającej cel pracy, metodykę, opis wyników badań, podsumowanie, wnioski i literaturę. W końcowej części pracy przedstawiono również sposób finansowania badań oraz oświadczenie autorów potwierdzających wiodącą rolę Doktorantki w przeprowadzeniu badań i przygotowaniu publikacji. Tytuły wspomnianych publikacji oraz czasopisma, w których zostały one zamieszczone wymieniam poniżej:

1. Wielkopolan, B., Obrępańska-Stęplowska, A. Three-way interaction among plants, bacteria, and coleopteran insects. *Planta* **244**, 313–332 (2016). <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2543-1>
2. Wielkopolan B, Walczak F, Podleśny A, Nawrot R, Obrępańska-Stęplowska A. Identification and partial characterization of proteases in larval preparations of the cereal leaf beetle (*Oulema melanopus*, Chrysomelidae, Coleoptera). *Arch Insect Biochem Physiol.* 2015 Mar;88(3):192-202. doi: 10.1002/arch.21223. Epub 2015 Jan 12. PMID: 25580929.
3. Wielkopolan, B., Krawczyk, K. & Obrępańska-Stęplowska, A. 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 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11829-018-9608-y>
4. Wielkopolan, B., Krawczyk, K., Szabelska-Beręsewicz, A. *et al.* The structure of the cereal leaf beetle (*Oulema melanopus*) microbiome depends on the insect's developmental stage, host plant, and origin. *Sci Rep* **11**, 20496 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99411-9>
5. Wielkopolan B, Frąckowiak P, Wiczorek P, Obrępańska-Stęplowska A. The Impact of *Oulema melanopus*-Associated Bacteria on the Wheat Defense Response to the Feeding of Their Insect Hosts. *Cells.* 2022 Jul 29;11(15):2342. doi: 10.3390/cells11152342. PMID: 35954184; PMCID: PMC9367625.

Należy podkreślić, że we wszystkich wspomnianych publikacjach mgr Beata Wielkopolan jest pierwszym autorem, a większość czasopism, w których opublikowano wyniki cieszy się uznana renomą w międzynarodowym środowisku naukowym, czego dowodem są wysokie wartości współczynnika oddziaływania. Sumaryczny IF prac będących przedmiotem rozprawy doktorskiej wynosi – 18,074, a liczba punktów według MNiSM – 370. Warto również dodać, że sumaryczna liczba cytowań wynosi – 64, a bez autocytowań – 55.

Należy wspomnieć, że włączone do rozprawy doktorskiej publikacje zostały zrecenzowane przez grono międzynarodowych ekspertów, członków komitetów redakcyjnych, a opublikowane w nich wyniki, a także najistotniejsze tezy i wnioski zawarte w dyskusjach stały się podstawą napisania dysertacji doktorskiej mgr Beaty Wielkopolan. Moja ocena przedstawionej pracy dotyczy całości dysertacji, rozumianej jako efekt podsumowania dotychczasowej działalności Doktorantki.

Rozprawa doktorska poświęcona jest jednemu z najgroźniejszych szkodników zbóż – skrzypionce zbożowej. Badania dotyczyły interakcji larw skrzypionek z ich rośliną żywicielską, z uwzględnieniem udziału zasocjowanych z larwami bakterii, jako modulatora reakcji obronnych roślin. Doktorantka wykonywała swoją pracę pod kierunkiem prof. Aleksandry Obrępańskiej-Stęplowskiej, która jest doświadczonym naukowcem o dużym dorobku publikacyjnym, dotyczącym molekularnych podstaw interakcji roślin z patogenami i szkodnikami oraz indukcji odporności, roli mikrobiomu w stresie biotycznym, odporności na pestycydy, a także diagnostyki patogenów i szkodników roślin.

Na plantacjach zbóż może pojawić się wiele szkodników powodujących obniżenie plonu. W ostatnim czasie zwiększa się występowanie skrzypionek - chrząszczy z rodziny stonkowatych. Szkodniki te można spotykać na różnych zbożach, ale szczególnie atakowane są przez nie jęczmień i pszenica. Owady dorosłe żerują na liściach zbóż, ale nie ma to większego znaczenia gospodarczego. W fazie strzelania w źdźbło pojawiają się larwy skrzypionki i to one powodują największe straty na plantacjach. Odżywiają się miękkiszem, zdrapując go wzdłuż nerwów liści. Efektem żerowania, są białe plamy wzdłuż nerwów liści. Najczęściej atakowane są liście – flagowy i podflagowy. Straty mogą być duże i sięgać do 40% plonu. Aktualną ochronę przed skrzypionkami stanowi płodozmian, jako podstawowy element obniżający ich liczebność. Konieczne są też zabiegi agrotechniczne niszczące larwy i poczwarki oraz zrównoważony program nawożenia plantacji roślin zbożowych, co pozytywnie wpływa na wzmocnienie zdrowotności roślin, ich potencjału obronnego oraz zdolności do regeneracji. Jeżeli chodzi o ochronę chemiczną, to zaleca się jej stosowanie dopiero po przekroczeniu ekologicznej szkodliwości tego owada (1-1,5 larwy na źdźbło dla zbóż ozimych i 0,5 – 1 larwy na źdźbło dla zbóż jarych). Należy jednak podkreślić, że obecnie obserwujemy silną tendencję odchodzenia od ochrony chemicznej, kładąc szczególny nacisk na poszukiwanie nowych przyjaznych dla środowiska alternatyw ograniczenia strat wyrządzanych przez larwy skrzypionek.

Dotychczasowe badania biologii skrzypionki zbożowej skupiały się w dużym stopniu na określaniu szkodliwości i wyznaczaniu optymalnego terminu jej zwalczania. Nie poznano dotąd mechanizmów obronnych zbóż podczas żerowania larw skrzypionek oraz mechanizmów adaptacyjnych tego agrofaga wobec syntetyzowanych przez roślinę tzw. "naturalnych insektycydów". Wiele związków syntetyzowanych przez rośliny jest uważanych za insektycydy. Szczególną uwagę badaczy zwrócili inhibitory proteaz, działające toksycznie, odstraszańco i antyżywniowo na roślinożerne owady. Należy dodać, że owady również wykształciły wiele przystosowań mających na celu ograniczenie szkodliwego działania mechanizmów ochronnych roślin.

Aby zmniejszyć straty wyrządzone przez larwy skrzypionek, konieczne okazało się poszukiwanie nowych, bardziej ekologicznych strategii. Doktorantka zajęła się więc scharakteryzowaniem oddziaływań roślina - owad, z uwzględnieniem bakterii związanych z owadem..

Szczególnie ciekawe wydaje się podjęcie badań dotyczących bakterii związanych z owadem, jako mediatora reakcji obronnych. Wiemy bowiem jak ważne znaczenie ma zespół drobnoustrojów zamieszkujących organizm człowieka, nie tylko dla naszego układu pokarmowego, ale także dla prawidłowego funkcjonowania wielu narządów oraz procesów odpornościowych.

Celem pracy była analiza profilu enzymów proteolitycznych larw skrzypionek wobec zastosowania inhibitorów proteaz, obejmująca identyfikację i charakterystykę aktywności tych enzymów. Badania obejmowały również analizę wpływu bakterii związanych z larwami na poziom ekspresji genów kodujących inhibitory proteaz oraz zmiany mikrobiomu bakteryjnego w zależności od różnych czynników, a także analizę zmian w transkryptomie roślin uszkodzonych przez larwy skrzypionek z naturalną mikroflorą lub zredukowanym komponentem bakteryjnym. W celu realizacji wspomnianych badań zastosowano odpowiednie metody badawcze, które zostały szczegółowo opisane w załączonych publikacjach.

Chciałem wyrazić uznanie dla Doktorantki i Pani Promotor za podjęcie interesującego, a zarazem trudnego tematu. Należy przyznać, że Pani mgr Beata Wielkopolan miała dużo szczęścia, mogąc go realizować w tak doświadczonym w tych sprawach zespole, co z pewnością ułatwiło każdy etap wykonywanej przez Nią pracy. Zauważalny w piśmiennictwie światowym brak wyników z zakresu problemu naukowego podjętego przez Doktorantkę, dodatkowo podkreśla oryginalność i trafność wyboru tematu. Na wyróżnienie zasługuje również fakt, że w jednej pracy znalazły się badania oddziaływań roślina – owad, z uwzględnieniem bakterii związanych z owadami, jako mediatora reakcji pszenicy w odpowiedzi na żerowanie larw skrzypionek.

Jak już wspomniałem, brak dostępnych danych w literaturze naukowej dotyczących enzymów proteolitycznych skrzypionek skłonił Doktorantkę do ich scharakteryzowania. Badania wykazały obecność czterech klas proteaz: cysteinowych, serynowych, aspartylowych i metaloproteaz. Wydaje się, że jest to korzystna cecha dla skrzypionek, ponieważ zwiększona aktywność proteaz niewrażliwych na działanie inhibitorów, może rekompensować hamowanie aktywności innych proteaz. Wykazano również, że larwy skrzypionek wykształciły mechanizmy niwelujące szkodliwe działanie inhibitorów proteaz. Traktowanie bowiem inhibitorem proteazy cysteinowej nie spowodowało spadku aktywności enzymów proteolitycznych. Należy dodać, że reakcja obronna roślin pszenicy na uszkodzenia wyrządzone przez larwy skrzypionek okazała się różna dla różnych odmian. Jak wynika z badań Doktorantki bakterie miały też wpływ na ekspresję genów kodujących inhibitory proteaz. Po zidentyfikowaniu enzymów proteolitycznych skrzypionek oraz wykazaniu ich przystosowań wobec inhibitorów proteaz, zajęto się identyfikacją bakterii zasocjowanych ze skrzypionkami. Zidentyfikowano 26 klas, 49 rzędów, 78 rodzin, 94 rodzaje i 63 gatunki bakterii. Struktura mikrobiomu bakteryjnego zależała od stadium rozwojowego owada, rośliny żywicielskiej oraz miejsca zebrania owadów. Dalsze badania Doktorantki dotyczyły określenia podstawowego

mikrobiomu skrzypionek. Okazało się, że podstawowy mikrobiom skrzypionki stanowią dwa rodzaje bakterii – Wolbachia i Rickettsia. Mają one wpływ na kondycję i rozwój skrzypionek, ale również na ich interakcję z rośliną żywicielską. W ostatniej części pracy doktorskiej zajęto się analizą odpowiedzi roślin pszenicy na uszkodzenia mechaniczne oraz żerowanie larw skrzypionki zbożowej, z uwzględnieniem modyfikującego wpływu bakterii związanych z tym agrofagiem. Analiza transkryptomu roślin wykazała istotnie większe zmiany w ekspresji genów w liściach uszkodzonych przez larwy. Bakterie związane ze skrzypionkami miały wpływ na wiele procesów fizjologicznych roślin pszenicy, między innymi na ekspresję genów związanych z fotosyntezą, szlakami sygnałowymi oraz metabolizmem podstawowym. Warto podkreślić, że bakterie zasocjowane ze skrzypionkami miały wpływ na supresję ekspresji genów związanych z procesami i szlakami, w ramach których są syntetyzowane metabolity, białka potencjalnie szkodliwe dla owada, co może mieć wpływ na modulację reakcji obronnych zbóż na korzyść ich owadziego gospodarza. Wynika więc z tego, że wiedza dotycząca składu gatunkowego populacji bakterii związanych z owadem i funkcji, jaką pełnią, może być przydatna do opracowania skutecznych metod ograniczających straty wyrządzone przez larwy skrzypionek.

Pewien niedosyt w pracy doktorskiej budzi brak w opracowaniu dyskusji. Nie chcę tego traktować jako zarzut, gdyż Doktorantka dowiodła bardzo dobrej orientacji w literaturze podczas dyskusji swoich wyników w pracach oryginalnych. Wydaje się jednak, że krótka dyskusja ułatwiłaby syntetyczne spojrzenie na cały obraz uzyskanych przez Doktorantkę wyników.

Pracę oceniam bardzo wysoko. Doktorantka wykazała się bardzo dobrym przygotowaniem teoretycznym, prawidłowo sformułowała hipotezę roboczą, a postawiony cel konsekwentnie realizowała. Autorka posiada umiejętność posługiwania się różnymi metodami badawczymi, korzystania z piśmiennictwa naukowego i prawidłowego wnioskowania. Sposób, w jaki przedstawiła dotychczasową wiedzę dotyczącą badanych zagadnień, szeroki zakres przeprowadzonych badań, a także umiejętność dyskusji potwierdza Jej bardzo dobre przygotowanie do pracy naukowej. Można również stwierdzić, że w znaczącej części praca ma charakter pionierski. Na tej podstawie stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca spełnia ustawowe warunki określone dla prac doktorskich w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym, z późniejszymi poprawkami, stanowiąc bardzo wartościową pozycję w badaniach dotyczących mechanizmów obronnych zbóż na żerowanie skrzypionek i wnosząc do Rady Naukowej Instytutu Ochrony Roślin – PIB w Poznaniu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Beaty Wielkopolan do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mając na uwadze wysoki poziom merytoryczny pracy, wiele elementów nowości, prawidłowe opracowanie dysertacji, wnioskuję o uhonorowanie pracy stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Stanisław Weidner

Olsztyn 14 listopada, 2022