

Załącznik 2
Autoreferat

1. Imię i nazwisko: **Iwona Sprawka**
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2001 - stopień doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biologia

Akademia Podlaska w Siedlcach, Wydział Rolniczy

promotor: Prof. dr hab. Antoni Piotr Ciepiela

Tytuł rozprawy doktorskiej „Zmiany w zawartości i składzie aminokwasowym białek pszenżyta ozimego wywołane żerowaniem mszycy zbożowej (*Sitobion avenae* /F/.)

1989 - stopień magistra biologii –specjalność biologia molekularna

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

promotor: Prof. dr hab. J. Łobarzewski

Tytuł pracy magisterskiej „Badanie elektroforetyczne aktywności proteolitycznych i keratynolitycznych *Trichophyton gallinae* oraz *Trichophyton verrucosum*”

Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych

01.09. 1989-31.08.1993 asystent, Katedra Biochemii i Toksykologii Środowiska,
Akademia Medyczna w Lublinie (obecnie Uniwersytet Medyczny w Lublinie)

01.09.1993- 30.09. 2001 asystent, Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej,
Wydział Rolniczy, Wyższa Szkoła Rolniczo- Pedagogiczna w Siedlcach
(w roku 1999 zmiana nazwy uczelni na Akademia Podlaska)

01.10. 2001-30.09.2013 adiunkt, Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej,
Wydział Przyrodniczy, Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach
(w roku 2010 zmiana nazwy uczelni na Uniwersytet Przyrodniczo-
Humanistyczny w Siedlcach)

01.10.2013 - do chwili obecnej starszy wykładowca, Katedra Biochemii i Biologii
Molekularnej, Wydział Przyrodniczy, Uniwersytet Przyrodniczo-
Humanistyczny w Siedlcach

Załącznik 2
Autoreferat

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego/ artystycznego:

Jako osiągnięcie wskazuję cykl pięciu publikacji oryginalnych na temat:

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

b) (autor/ autorzy, tytuł/ tytuły publikacji, nazwa wydawnictwa, rok wydania)

(IF według roku publikacji, punktacja czasopism naukowych MNiSW z dnia 17.12.2013)

1. Sprawka I. Effect of some proteins on biology of grain aphid (*Sitobion avenae* / F.). *Pestycydy/ Pesticides*, 2007, Vol.3-4/ 45-51.

Pkt. MNiSW: 4

2. Sprawka I, Goławska S, Effect of the lectin PHA on the feeding behavior of the grain aphid. *Journal of Pest Science*, 2010, 83, 149-155.

IF 0,988/ Pkt. MNiSW: 30

3. Sprawka I, Goławska S, Czerniewicz P, Sytykiewicz H. Insecticidal action of phytohemagglutinin (PHA) against grain aphid, *Sitobion avenae*. 2011, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2011, 100, 64-69.

IF 1,713/ Pkt. MNiSW: 30

4. Sprawka I, Goławska S, Goławski A, Czerniewicz P, Sytykiewicz H. Antimetabolic effect of phytohemagglutinin to the grain aphid *Sitobion avenae* Fabricius. *Acta Biologica Hungarica*, 2012, 63 (3): 342-353.

IF 0.504/ Pkt. MNiSW: 15

5. Sprawka I, Goławska S, Parzych T, Goławski A, Czerniewicz P, Sytykiewicz H. Induction of apoptosis in the grain aphid *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae)

Załącznik 2
Autoreferat

under the influence of phytohemagglutinin PHA. Applied Entomology and Zoology, 2013, 48, 525-532, DOI 10.1007/s13355-013-0214-2.

IF 0.819/ Pkt. MNiSW: 25

Wymienione powyżej publikacje wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej są cytowane zgodnie z nadaną im numeracją **(1-5)**

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Rozwój biotechnologii oraz możliwość sterowania informacją genetyczną zawartą w roślinach stwarza możliwość wprowadzania genów kodujących toksyczne biomolekuły do genomów roślinnych, co może prowadzić do wyhodowania roślin ograniczających rozwój roślinożernych owadów. W związku z tym poszukuje się metabolitów roślinnych zaangażowanych w mechanizmy reakcji obronnych skierowane przeciwko fitofagom oraz wykazujących entomotoksyczne właściwości. W tym kontekście, w ostatnich latach, wiele uwagi poświęca się białkom roślinnym wykazującym toksyczne oddziaływanie w stosunku do roślinożernych owadów do których oprócz inhibitorów enzymów zalicza się także roślinne lektyny.

Lektyny są białkami o nieimmunologicznym pochodzeniu, wykazującymi zdolność do specyficznego rozpoznawania i odwracalnego wiązania wolnych lub związanych ligandów cukrowych o charakterze mono- lub oligosacharydów. Białka te występują w organizmach znajdujących się na różnych szczeblach rozwoju ewolucyjnego (mikroorganizmy, grzyby, rośliny i zwierzęta). Jednak najlepiej scharakteryzowanymi lektynami pod względem struktury chemicznej oraz właściwości wiązania cukrów są lektyny pochodzenia roślinnego. 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. Ich obecność stwierdzono także w innych organach tj. korzeniach, liściach, owocach, bulwach, korze i kwiatach. Badania dotyczące lokalizacji komórkowej lektyn wykazały, że białka te występują głównie na powierzchni ścian i błon komórkowych, chociaż wyizolowano je także z frakcji retikulum endoplazmatycznego, aparatu Golgiego, lizosomów i mitochondriów.

Załącznik 2 Autoreferat

Mimo powszechnego ich występowania, 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, podtrzymywania lub wygaszania procesów metabolicznych. Procesy te są oparte na zdolności lektyn do rozpoznawania i wiązania cukrowców i warunkują one odbieranie i selekcjonowanie sygnałów spoza komórki. Lektyny roślinne są także ważnym czynnikiem regulacyjnym w transporcie wewnątrzkomórkowym, biorą m.in. udział w transporcie enzymów, od miejsc syntezy do miejsc ich gromadzenia lub działania oraz w regulowaniu ich aktywności. Według niektórych danych literaturowych lektyny są syntetyzowane w odpowiedzi na określone bodźce pochodzenia zewnętrznego (susza, oziębienie, zasolenie, zranienia, 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.

W związku z powyższym, ważnym obszarem badań w lektynologii są obecnie projekty dotyczące entomotoksycznych właściwości lektyn roślinnych, które mogą być wykorzystane w regulacji liczebności populacji fitofagów. Wyniki prac wskazują, że białka te negatywnie oddziałują na różne gatunki owadów zaliczanych do *Coleoptera*, *Hemiptera*, *Diptera* i *Lepidoptera*. Ich toksyczny wpływ w stosunku do fitofagów został potwierdzony zarówno w badaniach prowadzonych *in vitro* jak również w eksperymentach na roślinach wykazujących ekspresję genów kodujących te białka. Populacje owadów żerujących na dietach z lektynami lub na roślinach transgenicznych charakteryzują się zmianą wielu parametrów bionomicznych np. wyższą śmiertelnością, zmniejszonym przyrostem masy ciała, wydłużeniem okresu przedreprodukcyjnego lub obniżoną płodnością samic.

Mimo potwierdzonej owadobójczej aktywności lektyn roślinnych mechanizm ich insektycydalnego oddziaływania nie jest poznany i w pełni wyjaśniony. Zwraca się uwagę na fakt, że podstawowym czynnikiem warunkującym entomotoksyczność tych białek jest ich zdolność do przyłączania się do ugrupowań/receptorów sacharydowych obecnych w owadzich glikoproteinach lub glikolipidach zlokalizowanych na powierzchni komórek/organów. Prowadzi to do zaburzeń natury morfologicznej warunkując w konsekwencji zmiany w metabolizmie i funkcji poszczególnych organów/układów u owadów. Dane literaturowe wskazują również, że negatywne oddziaływanie lektyn

Załącznik 2 Autoreferat

roślinnych w stosunku do roślinożernych owadów może być związane z ich wpływem na zachowanie się owadów w trakcie żerowania, oddziaływaniem na tkanki docelowe oraz z indukcją zmian w ich metabolizmie. 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. Należy także dodać, że w piśmiennictwie z zakresu interakcji lektyny roślinne - roślinożerne owady niewiele jest prac naukowych dotyczących wyjaśnienia mechanizmu ich entomotoksycznych właściwości co leżało u podstaw wyboru tematyki badawczej prezentowanej w przedstawianym osiągnięciu naukowym. Dlatego zadaniem przeprowadzonych badań było poznanie podłoża interakcji między fitohemaglutyniną i mszycą zbożową. Stwarza to możliwość oceny i wyboru spośród lektyn roślinnych tych które są najbardziej skuteczne w ograniczeniu populacji danego gatunku owada i jednocześnie bezpieczne dla danego ekosystemu. Jest to także podstawowy warunek niezbędny do opracowania metod zapobiegających powstawaniu u fitofagów odporności nabytej na toksyczne białka/związki.

W przeprowadzonych badaniach wytyczono następujące cele etapowe:

1. porównanie wpływu różnych białek na przeżywalność mszycy zbożowej *Sitobion avenae*;
2. ocena wpływu lektyny izolowanej z fasoli zwykłej (fitohemaglutyniny, PHA) na bionomię i parametry populacyjne mszycy zbożowej;
3. zbadanie czy testowana lektyna wpływa na zachowanie mszycy zbożowej w trakcie żerowania;
4. określanie wpływu fitohemaglutyniny na aktywność enzymów mszycy zbożowej uczestniczących w przyswajaniu cukrowców i białek, metabolizmie fosforu oraz w detoksykacji związków toksycznych (α - i β - glukozydazy, kwaśnej i alkalicznej fosfatazy, aminopeptydazy leucynowej, katepsyny L);
5. zbadanie indukcji zmian w komórkach przewodu pokarmowego mszycy zbożowej pod wpływem fitohemaglutyniny.

Charakterystyka wyników otrzymanych w poszczególnych pracach, wchodzących w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego.

Załącznik 2 Autoreferat

W pracy rozpoczynającej cykl publikacji (publikacja nr 1) składających się na prezentowane osiągnięcie naukowe zamieszczono wyniki badań prowadzonych w warunkach *in vitro* dotyczące wpływu różnych białek (bromelaina, lizozym, jad pszczele, konkanawalina A, lektyna zarodka pszenicy) na wybrane parametry bionomiczne mszycy zbożowej. Przeprowadzone testy entomologiczne wykazały, że lektyny roślinne (konkanawalina A, lektyna zarodków pszenicy) w największym stopniu ograniczały ilość przyswojonego pokarmu i w związku z tym były najsilniejszymi inhibitorami wzrostu mszycy zbożowej. Ponadto białka te w największym stopniu ograniczały przeżywalność owadów oraz w przeprowadzonych testach wyboru odznaczały się najsilniejszymi właściwościami deterentnymi. Otrzymane wyniki stały się jedną z przesłanek do kontynuacji badań dotyczących entomotoksycznych właściwości lektyn roślinnych .

Podstawą do określenia negatywnego wpływu lektyn na owady są zmiany wartości poszczególnych parametrów bionomicznych. W celu ich określenia prowadzone są badania polegające na umieszczeniu owadów na sztucznych dietach zawierających badane lektyny w różnych stężeniach lub na roślinach transgenicznych charakteryzujących się ekspresją genów kodujących te białka. Do najczęściej badanych parametrów wskazujących na szkodliwość tych białek w stosunku do owadów są m.in.: masa i barwa ciała, liczebność potomstwa, śmiertelność/przeżywalność, ilość wydalanej rosy miodowej, płodność, długość okresu przedreprodukcyjnego (czas od urodzenia do dojrzałości płciowej) i czas rozwoju poszczególnych pokoleń.

Testy entomologiczne mające na celu ocenę entomotoksyczności fitohemaglutyniny w stosunku do mszycy zbożowej zostały przeprowadzone w warunkach *in vitro*, na płynnych dietach o optymalnym składzie i zawartości poszczególnych składników pokarmowych dla mszycy zbożowej do których dodano badaną lektynę w stężeniach od 10 do 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Otrzymane wyniki wskazują, że fitohemaglutynina oddziaływała negatywnie na dwa ważne parametry warunkujące rozwój populacji owadów: płodność mszycy zbożowej oraz okres osiągnięcia dojrzałości przez larwy (długość okresu przedreprodukcyjnego). W konsekwencji owady rozwijające się na dietach z fitohemaglutyniną charakteryzowały się wydłużeniem średniego czasu rozwoju pokolenia (T) oraz niskimi wartościami wskaźnika wrodzonego tempa wzrostu populacji (r_m). Ponadto fitohemaglutynina wykazywała toksyczny wpływ na mszycę zbożową poprzez ograniczenie również jej przeżywalności. Ponieważ wstępnym etapem oceny oddziaływania danej substancji na organizm jest określenie parametrów charakteryzujących toksyczność ostrą wyznaczono także wskaźnik LC₅₀, którego wartość

Załącznik 2 Autoreferat

dla fitohemaglutyniny wynosi $589 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Ponadto, stwierdzono występowanie negatywnych korelacji między stężeniami lektyny a płodnością samic mszycy zbożowej oraz wrodzonym tempem wzrostu populacji a także dodatnie zależności między koncentracją fitohemaglutyniny a pozostałymi parametrami bionomicznymi tzn.: długością okresu przedreprodukcyjnego, średnim czasem rozwoju pokolenia i śmiertelnością. (wyniki opublikowane w publikacji nr **3, 4 i 5**).

Dane literaturowe wskazują, że toksyczne oddziaływanie lektyn może opierać się na ich zdolności przyłączania się do glikozyłowanych białek receptorowych sensilli smakowych, zlokalizowanych w błonach otworu gębowego owadów. Powoduje to blokowanie ich dostępności dla sygnałów chemicznych odpowiedzialnych za rozpoznawanie stymulatorów pokarmowych, prowadząc do hamowania żerowania fitofagów. Dlatego kolejnym etapem badań było wyjaśnienie czy fitohemaglutynina wpływa na zachowanie się mszycy zbożowej w trakcie żerowania. W tym celu przeprowadzono elektroniczny monitoring zachowania się tego fitofaga podczas żerowania wykorzystując technikę DC EPG (ang. *electronic penetration graphs*). Technika ta służy do badania zachowania owadów o kłująco - ssącym narządzie gębowym w trakcie penetracji tkanek roślinnych. Pozwala ona rejestrować mechaniczne ruch sztyletów, wydzielanie śliny oraz pobieranie płynów z elementów floemu i ksylemu oraz zapisywanie powyższych aktywności owada w postaci graficznych modeli EPG. Metoda ta znalazła zastosowanie w badaniach porównawczych zachowania się owadów na roślinach żywicielskich jak również gatunkach nie będących ich żywicielami. Ponadto, umożliwia ona m.in. wykrywanie mechanizmów odporności naturalnej w dzikich i użytkowych gatunkach roślin oraz badania mechanizmów przenoszenia wirusów przez mszyce. Technikę EPG wykorzystuje się także w celu określenia wpływu związków chemicznych o charakterze stymulatorów i deterentów na zachowanie się owada. Badania tego rodzaju są prowadzone się w warunkach *in vitro* poprzez rejestrację zachowania się owadów podczas nakłuc sztucznych diet o charakterze płynnym lub stałym (żele agarozowo-sacharozowe, agarozowo-pektynowe, poliakryloamidowe) do których dodawane są testowane związki w różnym stężeniu.

W przeprowadzonych doświadczeniach rejestrację zachowania się samic *S. avenae* przeprowadzono na żelach agarozowo-sacharozowych, zawierających lektynę PHA o różnym stężeniu ($10 - 1500 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Modele EPG stwierdzone u mszyc w warunkach *in vitro* zostały zinterpretowane w oparciu o modele obserwowane u mszyc żerujących na roślinach (*in vivo*). Stwierdzono występowanie takich aktywności jak: ruchy sztyletów mszyc w żelu

Załącznik 2 Autoreferat

(analogiczne do aktywności sztyletów mszyc w epidermie i mezofilu – EPG model C w tkankach roślin), wydzielanie śliny do żelu (analogiczne do wydzielania śliny do elementów floemu – EPG model E1), pobieranie fluidu z żelu (analogiczne do pobieraniu soku floemowego – EPG model E2) oraz aktywne pobieranie fluidu z żelu (analogiczny do aktywnego pobierania soku ksylemowego - EPG model G). Obserwowano także brak penetracji żelu (analogiczny do braku penetracji tkanek roślinnych – EPG model np). Przeprowadzone badania wykazały, że dodanie fitohemaglutyniny do żeli agarozowo-sacharozowych powodowało redukcję aktywności sztyletów mszyc w żelu a także wydłużenie czasu tej aktywności (C model EPG). Stwierdzono ponadto, że 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 ($\geq 500 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$), całkowicie hamowała powyższe aktywności. Ponadto analiza zarejestrowanych modeli EPG wykazała, że lektyna PHA skracala czas trwania pierwszego modelu E1 i E2. Podobne zależności zaobserwowano odnośnie aktywności mszyc związanej z aktywnym pobieraniem fluidu (G model EPG). Wyższe stężenia lektyny PHA powodowały redukcję tej aktywności oraz indukowały skrócenie czasu trwania pierwszego G modelu EPG a także redukcję całkowitego czasu trwania modelu G. (wyniki opublikowane w publikacji nr 2 i 3).

Kolejny etap badań miał na celu wyjaśnić czy jednym z czynników warunkującym toksyczność lektyn są ich interakcje z enzymami owadów, które mogą prowadzić do zaburzeń w ich funkcji, a w rezultacie do szkodliwego wpływu na metabolizm owada. Wielu autorów twierdzi bowiem, że wiązanie się lektyn roślinnych z resztami sacharydowymi może skutkować spadkiem liczby centrów aktywnych enzymów, poprzez blokowanie ich dostępności dla substratu. Lektyny mogą także powodować spadek lub wzrost aktywności enzymów wiążąc substrat lub też przyłączać się zarówno do cząsteczek enzymu jak i substratu wpływając tym samym na powinowactwo między nimi.

Badania dotyczące tego aspektu toksyczności lektyn prowadzono także w warunkach *in vitro*, stosując żele agarozowo-sacharozowe w których rozpuszczono lektynę PHA w różnych stężeniach: $10-1500 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Następnie w tkankach owadów nakłuwających żele oznaczano aktywność następujących enzymów: α - i β -glukozydazy, kwaśnej i alkalicznej fosfatazy, aminopeptydazy N oraz katepsyny L. Enzymy te uczestniczą w przyswajaniu cukrowców i białek, metabolizmie fosforu oraz w detoksykacji allelozwiązków. Przeprowadzone badania wykazały, że testowana lektyna powodowała spadek aktywności α -glukozydazy oraz fosfatazy alkalicznej w tkankach mszycy zbożowej przy czym poziom inhibicji tego

Załącznik 2 Autoreferat

enzymu był ściśle związany ze stężeniem lektyny. Wykazano również, że niższe stężenia fitohemaglutyniny wywoływały wzrost aktywności β -glukozydazy oraz fosfatazy kwasnej, natomiast wyższe testowane stężenia lektyny powodowały spadek aktywności tych enzymów w tkankach żerujących owadów. Ponadto, testowana lektyna stymulowała aktywność katepsyny L, wpływając jednocześnie na spadek aktywności drugiej z badanych proteaz, aminopeptydazy N. (wyniki opublikowane w publikacji nr **3 i 4**).

Wiele glikoprotein obecnych jest w przewodzie pokarmowym owadów, dlatego autorzy licznych publikacji twierdzą, że komórki i tkanki tego układu są głównym miejscem przyłączania się lektyn roślinnych. Skutkuje to obrzękiem, dezintegracją oraz lizą komórek epitelialnych, co może prowadzić do zaburzeń funkcji trawiennych, sekrecyjnych i ochronnych przewodu pokarmowego roślinożernych owadów. Najnowsze badania wskazują, że lektyny wiążąc się z częścią cukrową glikoprotein lub glikolipidów znajdujących się na powierzchni komórki mogą prowadzić do aktywacji oraz transdukcji procesu apoptozy i w związku z tym może być to jeden z czynników leżących u podstaw toksyczności tych białek. Apoptoza jest bowiem procesem komórkowym mającym na celu eliminację niepotrzebnych bądź uszkodzonych komórek. Morfologiczny i fizjologiczny aspekt apoptozy obejmuje tworzenie pęcherzyków błonowych, obkurczanie się komórki, kondensację chromatyny oraz fragmentację DNA. Szereg wyspecjalizowanych białek bierze udział w procesie apoptozy. Wśród nich, za bardzo ważne uważane są kaspazy, które pełnią funkcje zarówno inicjującą jak i wykonawczą w procesie programowanej śmierci komórki.

Badając wpływ fitohemaglutyniny na indukcję apoptozy zastosowano płynną dietę o optymalnym składzie i zawartości składników pokarmowych dla mszycy zbożowej do której dodano testowaną lektynę. Przeprowadzone badania wykazały, że komórki nabłonka jelitowego owadów żerujących na dietach zawierających fitohemaglutyninę odznaczały się podstawowymi cechami charakterystycznymi dla apoptotycznych komórek: 1) tzw. „drabinkowym” obrazem DNA w otrzymanych elektroferogramach; 2) indukcją aktywności kaspazy 3, kluczowego enzymu (kaspaza wykonawcza) uczestniczącego w szlaku apoptozy. (wyniki opublikowane w publikacji nr **5**)

Podsumowując, wyniki badań przedstawione w publikacjach składających się na prezentowane osiągnięcie naukowe wykazały, że fitohemaglutynina charakteryzuje się toksycznym oddziaływaniem w stosunku do mszycy zbożowej. Jej owadobójcze właściwości związane są z: 1) hamowaniem żerowania owadów a więc z właściwościami deterentnymi; 2) ingerencją w aktywność enzymów prowadzącą do zaburzeń ich funkcji a w rezultacie do

szkodliwego wpływu na metabolizm owada; 3) cytotoksycznością skutkującą zaburzeniami morfologiczno - fizjologicznymi przewodu pokarmowego powodującymi wzrost śmiertelności owadów. Ponadto, wyniki te wskazują, że negatywne oddziaływanie fitohemaglutyniny na tego fitofaga może być uwarunkowane różnymi mechanizmami jej toksycznej aktywności.

Współczesna hodowla, selekcja oraz racjonalna uprawa roślin dążą do korzystania z nowoczesnych osiągnięć biotechnologii, zwłaszcza w zakresie wykorzystania bogatego potencjału związków naturalnie występujących w tkankach roślin. Przeprowadzone badania wpisują się więc w ogólnoświatowe tendencje poszukiwania tzw. „owadobójczych” genów i mogą zostać wykorzystane w biotechnologicznych projektach związanych z hodowlą roślin odpornych na roślinożerne owady. Pozwala to na poszerzenie biologicznych strategii ograniczania populacji fitofagów które coraz częściej są niewrażliwe na syntetyczne środki owadobójcze a także umożliwia zachowanie naturalnych walorów środowiska przyrodniczego.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Studia biologiczne rozpoczęłam w 1984 na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie- Skłodowskiej w Lublinie. Moje zainteresowania naukowe w tym czasie skupiały się wokół zagadnienia metabolizmu grzybów i ich udziału w biotransformacji polimerów roślinnych. Ponieważ jednym ze szczegółowych aspektów w tych badaniach była charakterystyka enzymów grzybowych, celem mojej pracy magisterskiej, którą przygotowywałam pod kierunkiem Prof. dr hab. Jerzego Łobarzewskiego, była elektroforetyczna identyfikacja aktywności proteolitycznej i keratynolitycznej dwóch gatunków dermatofitów: *Trichophyton verrucosum* i *Trichophyton gallinae*. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów ustaliłam, że badane gatunki grzybów charakteryzowały się poszukiwanymi aktywnościami enzymatycznymi, które mogą odgrywać podstawową rolę w ich patogenezie. Jednak *T. verrucosum* odznaczał się silniejszą aktywnością proteolityczną i keratynolityczną zewnątrzkomórkową w porównaniu do gatunku *T. gallinae* który charakteryzował się większą aktywnością wewnątrzkomórkową tych enzymów. W dniu 1 czerwca 1989 zdałam egzamin magisterski, otrzymując tytuł magistra biologii w zakresie specjalności biologia molekularna.

Załącznik 2 Autoreferat

Od dnia 1.09.1989 zostałam zatrudniona w Katedrze Biochemii Klinicznej i Toksykologii Środowiska Akademii Medycznej w Lublinie na etacie asystenta. Pierwszy rok swojej pracy zawodowej poświęciłam na poznanie technik i metod badawczych specyficznych dla tego typu jednostek co było związane z całkowitą zmianą problematyki badawczej. W latach 1990-1993 przebywałam na urlopie wychowawczym.

Od 1.09.1993 podjęłam pracę na stanowisku asystenta w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej Wyższej Szkoły Rolniczo-Pedagogicznej (WSRP) w Siedlcach, z którą jestem związana do chwili obecnej. Wiodące tematy badawcze tej jednostki skupiały się na zagadnieniach związanych z biochemicznymi i molekularnymi oddziaływaniami rośliny - roślinożerne owady, ze szczególnym uwzględnieniem mszyc. Jednym z kierunków w tych badaniach było poznanie biochemicznych mechanizmów naturalnej odporności roślin na te fitofagi. W ramach tego zagadnienia prowadziłam badania nad udziałem wybranych składników pokarmowych w interakcjach między tymi owadami (mszyca zbożowa, *Sitobion avenae* F.; mszyca różano-trawowa, *Metopolophium dirhodum* Walk.; mszyca czeremchowo-zbożowa, *Rhopalosiphum padi* L.) a roślinami charakteryzującymi się różnym stopniem akceptacji przez tych roślinożerców, uczestnicząc w realizacji tematu badań statutowych 14/91/S „Rola kompleksu cukrowo-azotowego w oddziaływaniach mszyc zbożowych i roślin żywicielskich” oraz badań własnych 475/92/W „Wpływ składu chemicznego pokarmu na biologię mszycy zbożowej”. Do składników pokarmowych które mogą wywierać istotny wpływ na wzrost i rozwój mszyc są aminokwasy, peptydy i białka które stały się głównym przedmiotem moich zainteresowań naukowych. Białka roślinne stanowią podstawowe źródło aminokwasów dla tych owadów. W ślinie mszyc obecne są enzymy proteolityczne, które hydrolizują białka, dostarczając tym owadom aminokwasów niezbędnych do ich prawidłowego rozwoju. Wcześniejsze badania prowadzone przez pracowników Katedry Biochemii i Biologii Molekularnej wykazały, że niska zawartość białka i aminokwasów białkowych w roślinach żywicielskich obniżała ich wartość odżywczą dla mszyc. Stwierdzono również, że różnice w jakościowo-ilościowym składzie białek roślinnych odgrywają ważną rolę w mechanizmach odpornościowych roślin w stosunku do tych owadów. Dotychczasowe badania dotyczące udziału białek w interakcjach rośliny zbożowe - mszyce ograniczały się do określania ich całkowitej zawartości (białko rozpuszczalne, cytoplazmatyczne, ogólne i właściwe) w badanych gatunkach i odmianach zbóż. Nie analizowano natomiast roli poszczególnych frakcji białkowych w tych oddziaływaniach. Dlatego celem podjętych przeze mnie badań w tamtym okresie było określenie udziału białek

Załącznik 2 Autoreferat

prostych, tzn. albumin, globulin, prolamin i glutelin w oddziaływaniach zachodzących między mszycą zbożową (*Sitobion avenae*/F./) a pszenżytem ozimym. Określiłam, zawartość i skład aminokwasowy analizowanych frakcji białkowych i ich związek ze stopniem akceptacji odmian pszenżyta ozimego przez mszycę zbożową. Podjęte badania obejmowały także ocenę zmian w zawartości, składzie aminokwasowym i elektroforetycznym albumin, globulin, prolamin i glutelin wywołanych żerowaniem tego owada. Jednocześnie prowadziłam monitoring odmian pszenicy i pszenżyta pod kątem ich stopnia akceptacji przez mszyce zbożowe. Wyniki tych obserwacji pozwoliły wytypować odmiany różniące się akceptacją przez te fitofagi do badań biochemicznych mechanizmów odpornościowych. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wykazały, że analizowane białka, a zwłaszcza albuminy i globuliny należą do czynników kształtujących zróżnicowany poziom akceptacji odmian pszenżyta ozimego przez mszycę zbożową. Wykazałam ponadto, że w interakcjach między badanymi roślinami, a żerującymi na nich mszycami duże znaczenie odgrywała zawartość tych białek, jak również ich skład aminokwasowy i elektroforetyczny. Efektem tych badań była moja praca doktorska wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Antoniego P. Ciepeli pt., „Zmiany w zawartości i składzie aminokwasowym białek pszenżyta ozimego wywołane żerowaniem mszycy zbożowej (*Sitobion avenae* /F/)”. Uzyskane wyniki dostarczyły nowych informacji do charakterystyk odmianowych badanych odmian pszenżyta w zakresie ich naturalnej odporności na mszyce zbożowe. Ponadto wniosły znaczący wkład do hodowli i selekcji odmian odpornych dla integrowanych programów ochrony zbóż (uwzględniają aspekty proekologiczne) przed mszycami oraz pozwoliły na badanie szczegółowych mechanizmów odpornościowych zbóż.

Wartość biologiczna (odżywcza) białka to tylko jeden z czynników kształtujących interakcje między białkami występującymi w roślinie żywicielskiej a mszycami. Relacje te są z reguły dodatnie to znaczy, im więcej białka zawiera roślina żywicielska tym jest ona korzystniejszym źródłem pokarmu dla zasiedlających ją owadów. Dane literaturowe wskazują również na niekorzystne oddziaływanie niektórych białek roślinnych na wzrost i rozwój mszyc. Jedną z grup białek rozpatrywanych w tym kontekście są inhibitory enzymów proteolitycznych, wykazujące przede wszystkim aktywność antytrypsynową lub w mniejszym stopniu antychymotrypsynową. Zwraca się także uwagę na fakt, że cząsteczki te mogą stanowić ważny element mechanizmu obronnego roślin przeciw owadom, dlatego to zagadnienie było kolejnym aspektem badanych przeze mnie interakcji rośliny żywicielskie-roślinozerne owady. Do badań wybrano odmiany o zróżnicowanym stopniu akceptacji przez

Załącznik 2 Autoreferat

mszycę zbożową: Tewo, Lamberto, Migo- chętniej zasiedlane przez *S. avenae* i Malno Fidelio, Wanad- w mniejszym stopniu akceptowane przez tego fitofaga. Przeprowadzone badania wykazały, że żerowanie owadów indukowało znaczący wzrost aktywności antytrypsynowej w tkankach roślin porażonych w stosunku do roślin kontrolnych, przy czym na organach odmian charakteryzujących się niższym zagęszczeniem populacji *S. avenae* był on znacznie wyższy, w porównaniu do odmian w większym stopniu akceptowanych przez tego owada. 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 przed atakiem szkodników. Ponadto wysoki poziom aktywności antytrypsynowej w tkankach roślin może powodować zmniejszenie aktywności enzymów trawiennych owada, a to z kolei wpływało na słabsze wykorzystanie składników pokarmowych pobieranych z rośliny.

Jednocześnie uczestniczyłam także w innych badaniach których celem było określenie roli roślinnych allelozwiązków jako naturalnych czynników odpornościowych. Allelozwiązki, definiowane są jako wtórne metabolity wytwarzane przez rośliny, zdolne do wpływu na zachowanie, fizjologię i parametry populacyjne innych gatunków roślin i zwierząt. Pełnią one istotne funkcje zarówno fizjologiczne, metaboliczne jak i ekologiczne, jako substancje pośredniczące w oddziaływaniach między różnymi organizmami. Dzięki tym związkom rośliny mają m.in. zdolność do skutecznego przeciwstawiania się czynnikom środowiskowym (infekcja przez patogeny, mechaniczne uszkodzenia, promieniowanie UV, żerowanie owadów) poprzez uruchamianie wieloskładnikowego mechanizmu obronnego. Ważną rolę w tych interakcjach przypisuje się związkom fenolowym i enzymom uczestniczącym w ich metabolizmie. We współpracy z dr hab. Grzegorzem Chrzanowskim wykazałam, że rośliny pszenżyta charakteryzujące mniejszą akceptacją przez mszycę zbożową odznaczały się wyższą zawartością wybranych kwasów fenolowych oraz reagowały na żerowanie owadów wzmożoną ich biosyntezą. Było to związane z podwyższoną aktywnością amoniako-liazy - *L*-fenyloalaniny i *L*-tyrozyny (PAL/TAL) zaangażowanych w ich syntezę. Ponadto odmiany pszenicy i pszenżyta odznaczające się niższym zagęszczeniem populacji *S. avenae* posiadały wyższą aktywność oksydazy polifenolowej (PPO) katalizującej przekształcanie wtórnych metabolitów fenolowych do toksycznych chinonów co także może stanowić ważny element strategii obronnej roślin w stosunku do tych fitofagów. Jednym z ważnych zagadnień w badaniach dotyczących interakcji roślinne

Załącznik 2 Autoreferat

allelozwiązki - roślinożerne owady jest określenie ich wpływu na fizjologię owadów. W ostatnich latach duże zainteresowanie budzą szczególnie dwie klasy metabolitów wtórnych: saponiny i flawonoidy. W ramach tego zagadnienia wspólnie z dr Sylwią Goławską badałam wpływ wybranych flawonoidów (flawanonu naryngeniny i flawanolu kwercetyny jak i mieszanin (flawonoidów i saponin): apigeniny i 3GlcA, 28AraRhaXyl kwasu medikagenowego, 3Glc, 23Ara, 28AraRahaXylApi kwasu zanowego (tridesmozyd kwasu zanowego) na zachowanie podczas żerowania mszycy grochowiej (*Acyrtosiphon pisum* Harris). Wykonano elektroniczny monitoring zachowania się dorosłych samic mszycy grochowiej *in vitro* podczas nakłuwania żeli agarozowo-sacharozowych, zawierających badane związki. Generalnie, dodanie testowanych flawonoidów do żeli powodowało redukcję aktywności związanej z pobieraniem pokarmu. Przy wyższych stężeniach ($> 1000 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), flawonoidy całkowicie hamowały aktywności odpowiadające wydzielaniu śliny oraz pobieraniu pokarmu. Mieszaniny saponin z apigeniną redukowały liczbę penetracji żeli i skracały czas ich trwania. Obserwowano także redukcję aktywności związanej z wydzielaniem śliny oraz wydłużaniem pobierania fluidu z żelu. Stwierdzono, że różnice podczas nakłuwania żeli zawierających mieszaniny testowanych związków, zależały zarówno od składu mieszaniny jak również stężenia występujących w niej substancji.

W latach 2007-2009 wspólnie z dr Hubertem Sytykiewiczem uczestniczyłam w badaniach określających częstość występowania wybranych mikroorganizmów patogennych dla człowieka w tkankach kleszcza pospolitego (*Ixodes ricinus* L.) odłowionych na obszarze środkowej i wschodniej Polski. W badaniach tych skoncentrowano się na 17 różnych habitatów (Kampinoski Park Narodowy; Nadbużański Park Krajobrazowy; parki miejskie, obszary podmiejskie i tereny wiejskie na terenie powiatów - Biała Podlaska, Siedlce, Warszawa i Płock) w obrębie których zebrano nimfy i osobniki *imago* kleszcza pospolitego posługując się metodą flagową. W pierwszym etapie badań molekularnych wyodrębniono genomowe DNA z badanych prób pajęczaków, a następnie przeprowadzono spektrofotometryczną i elektroforetyczną ocenę jakościowo-ilościową otrzymanych preparatów. Zastosowano klasyczny wariant techniki PCR oraz *nested*-PCR w celu przeprowadzenia detekcji gDNA następujących patogennych drobnoustrojów: *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*). Stwierdzono, że 8,5% testowanych kleszczy było zainfekowanych *A. phagocytophilum*, 3,1% było nosicielami *B. microti*, zaś 1,8% osobników było zakażonych

Załącznik 2 Autoreferat

dwoma wyżej wymienionymi patogenami. Najwyższą prevalencję koinfekcji *A. phagocytophilum* + *B. microti* stwierdzono w tkankach kleszczy odłowionych w parkach miejskich w Warszawie i terenach podmiejskich (odpowiednio 3,3 i 4,8%). Znacznie niższą częstość występowania kleszczy zakażonych przez *A. phagocytophilum* i *B. microti* odnotowano na obszarze Kampinoskiego Parku Narodowego i Nadbużańskiego Parku Krajobrazowego (1,4 i 1,1%). Materiał genetyczny *B. henselae* został zidentyfikowany u 4,8% osobników *I. ricinus*, DNA *B. burgdorferi* s.l. wykryto u 12,3% kleszczy, natomiast koegzystencję wymienionych patogenów stwierdzono tylko u 1,4% badanych pajęczaków. Najwyższy poziom prevalencji koinfekcji *B. henselae* + *B. burgdorferi* s.l. w osobnikach *I. ricinus* odnotowano na zalesionych obszarach okolic Warszawy, zaś najniższy w lasach powiatu płockiego i rezerwatu Korczew-Mogielnica w Nadbużańskim Parku Krajobrazowym. Nie stwierdzono obecności *B. henselae* w tkankach kleszczy odłowionych w pięciu stanowiskach (rezerwaty Ceranów i Jerzyska - Nadbużański Park Krajobrazowy, obszary zieleni miejskiej w Siedlcach, Białej Podlaskiej i Międzyrzecu Podlaskim). Wśród badanych kleszczy dominowała obecność pojedynczego genogatunku *B. burgdorferi* s.l., stan koegzystencji dwóch gatunków krętków wykryto u 1,6% osobników, natomiast jednoczesne występowanie DNA trzech gatunków zawierało 0,4% prób. Należy podkreślić, że koegzystencję 2 lub 3 gatunków *Borrelia* potwierdzono wyłącznie w tkankach dojrzałych osobników, natomiast larwy i nimfy były gospodarzami pojedynczego gatunku krętka. Przeprowadzone badania pozwoliły ocenić udział populacji kleszcza pospolitego w środkowej i wschodniej Polsce w cyrkulacji chorobotwórczych dla człowieka mikroorganizmów, a ponadto oszacować stopień zagrożenia infekcjami odkleszczowymi na badanych obszarach.

Jestem również wykonawcą w granice pt. „Ocena przydatności markerów ekspresyjnych stresu oksydacyjnego w selekcji odmian kukurydzy zwyczajnej o zróżnicowanej podatności na mszyce zbożowe” (numer rejestrowy N N310 733940), finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w Krakowie, realizowanym w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej UPH w Siedlcach (2011-2014). Testy entomologiczne przeprowadzono w warunkach kontrolowanych (pokój hodowlany) na siewkach piętnastu odmian kukurydzy zwyczajnej: Ambrozja F1, Anawa F1, Delitop, Dobosz, Eleganza, Gucio, Makila, Nana, Narew, Płomyk, Rataj, Tasty Sweet, Touran, Waza i Złota Karłowa. Wykonano trzy niezależne serie doświadczeń, które wykazały, że bezskrzydłe samice obydwu badanych gatunków pluskwiaków (mszyca czeremchowo-zbożowa – *Rhopalosiphum padi* L. i mszyca zbożowa - *Sitobion avenae* F.) nie wydawały

Załącznik 2 Autoreferat

potomstwa na siewkach kukurydzy odmiany Rataj i Narew. Stwierdzono silne antybiotyczne oddziaływanie odmiany Anawa w stosunku do testowanych gatunków mszyc, wyrażające się najdłuższym okresem przedreprodukcyjnym oraz bardzo niskimi wartościami pozostałych określanych parametrów bionomicznych. Równocześnie wykazano, że odmiany Ambrozja i Płomyk charakteryzowały się dość wysokim poziomem antybiozy wobec badanych gatunków owadów. Wykonane testy bionomiczne dowiodły, że najkrótszy okres przedreprodukcyjny i najwyższe wrodzone tempo wzrostu populacji oraz płodność dzienną i całkowitą osiągnęły osobniki *R. padi* i *S. avenae* rozwijające się na siewkach dwóch odmian kukurydzy zwyczajnej – ‘Złota Karłowa’ i ‘Tasty Sweet’. Wśród testów oceniających tolerancję siewek badanych odmian kukurydzy na uszkodzenia wywołane żerowaniem mszyc zbożowych przeprowadzono test rozkładu chlorofili (w jednostkach SPAD, posługując się zautomatyzowanym miernikiem Chlorophyll Meter SPAD 502, Minolta) oraz wyznaczono poziom indeksu wagowego. Najniższą tolerancję na uszkodzenia wywoływane przez mszyce zbożowe stwierdzono w przypadku odmian ‘Złota Karłowa’ i ‘Tasty Sweet’, zaś najwyższym poziomem tolerancji na żerowanie testowanych stawonogów odznaczały się odmiany: Anawa, Ambrozja i Płomyk. Należy podkreślić, że podobnie jak w przypadku biotestów antybiozy, osobniki badanych gatunków mszyc nie wydawały potomstwa na siewkach kukurydzy odmiany Rataj i Narew. Wytypowano także do badań molekularnych dwie odmiany kukurydzy podatne na żerowanie mszyc (‘Złota Karłowa’ i ‘Tasty Sweet’), jak również dwie odmiany względnie odporne (‘Amrozja’ i ‘Płomyk’). Porównano zmiany w relatywnym poziomie ekspresji genów kodujących izoenzymy dysmutazy ponadtlenkowej (*sod2*, *sod3.4*, *sodB*, *sod9*) oraz izoformy transferazy glutationowej (*gst1*, *gst23*, *gst24*) po 1-72 godz. żerowania testowanych gatunków mszyc. Stwierdzono, że ekspresja badanych genów *sod* uległa stymulacji już w pierwszych godzinach żerowania owadów, zaś najwyższy poziom aktywności transkrypcyjnej odnotowano po 8 godz. (*sod2* i *sod3.4*) lub 24 godz. (*sod9* i *sodB*). Znacznie wyższy poziom ekspresji wykazano w tkankach odmian względnie odpornych w porównaniu z genotypami wrażliwymi na żerowanie mszyc. Odwrotną tendencję zaobserwowano w przypadku transkryptu *sodB* po 48 i 72 godzinach od zasiedlenia, gdy stwierdzono spadek ekspresji tego genu w odniesieniu do roślin kontrolnych. Testowane gatunki mszyc zbożowych indukowały wzrost ilości transkryptów transferazy glutationowej (*gst1*, *gst23* i *gst23*), przy czym względnie odporne odmiany kukurydzy reagowały wyższym przyrostem aktywności transkrypcyjnej w stosunku do genotypów podatnych. Maksymalny wzrost poziomu ekspresji stwierdzono po 8 godz. żerowania (gen

Załącznik 2
Autoreferat

gst23) lub 24 godz (*gst23* i *gst24*). Jednocześnie warto podkreślić, że mszyca czeremchowo-zbożowa (oligofag) stymulowała większe zmiany w ekspresji badanych genów aniżeli mszyca zbożowa (monofag). Obecnie prowadzone są analizy poziomu aktywności transkrypcyjnej genów odpowiedzialnych za biosyntezę trzech izoform katalazy (*cat1*, *cat2*, *cat3*), peroksydazy glutationowej (*GPx*), reduktazy glutationowej (*GR*), reduktazy dehydroaskorbinianowej (*DHAR*) oraz peroksydazy askorbinianowej (*APx*) w tkankach siewek *Z. mays* zasiedlonych przez mszyce zbożowe. W wyniku przeprowadzonych badań planowane jest określenie markerów ekspresyjnych stresu oksydacyjnego indukowanego żerowaniem mszyc zbożowych, a także zweryfikowanie, które z wyłonionych markerów są powiązane ze stopniem podatności roślin na mszyce.

Od roku 2008 jestem również wykonawcą w projekcie badań statutowych 245/S/08 „Poszukiwanie naturalnych biopestycydów”, prowadzonym przez Katedrę Biochemii i Biologii Molekularnej, w ramach którego prowadzę badania dotyczące entomotoksycznych właściwości lektyn roślinnych, które mogą okazać się skutecznymi i naturalnymi czynnikami w walce z roślinożernymi owadami. Wyniki moich badań dotyczące owadobójczych właściwości jednej z lektyn roślinnych, fitohemaglutyniny są tematem cyklu publikacji składających się na prezentowane w tym autoreferacie osiągnięcie naukowe. Poszczególne lektyny roślinne charakteryzują się różnymi mechanizmami toksycznego oddziaływania w stosunku do fitofagów, co jest związane z ich zróżnicowaną specyficznością sacharydową. Dlatego następnym obiektem moich badań jest konkanawalina A, lektyna izolowana z kanawalii mieczokształtnej (*Canavalia ensiformis*). Dotychczas otrzymane wyniki, potwierdzają tę hipotezę oraz wskazują że zróżnicowane powinowactwo lektyn do komponentów sacharydowych może warunkować także zróżnicowany poziom ich toksyczności w stosunku do roślinożernych owadów. Dalsze badania z tego zakresu będą 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*).

Twona Spwawka.

Siedlce, 12.03.2014.