

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Spochacz
pt. "Działanie ekstraktu z *Solanum nigrum* L. i jego głównych glikoalkaloidów, jako czynników zwiększających toksyczność insektycydu fenitrothionu w wybranych tkankach *Tenebrio molitor* L."

„Effects of *Solanum nigrum* L. extract and its main glycoalkaloids on selected tissues of *Tenebrio molitor* L. as factors increasing the toxicity of fenitrothion insecticide”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani magister Marty Spochacz, wykonana została pod kierunkiem Pana prof. UAM dr hab. Zbigniewa Adamskiego i Pani dr Moniki Szymczak-Cendlak na Wydziale Biologii w Instytucie Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Rozprawa dotyczy alkaloidów psianki czarnej, które wykazują letalne i subletalne efekty względem wielu owadów, w tym szkodników magazynowych. Przedmiotem pracy było zbadanie wpływu ekstraktu z niedojrzałych owoców psianki czarnej na wybrane aspekty fizjologii szkodnika magazynowego jakim był mącznik młynarek (*Tenebrio molitor*). Doktorantka wyodrębniła z ekstraktu główne dwa glikoalkaloidy – solasoninę i solamarginę i określiła

- efekt ich podania owadom w zależności od tego, czy testowane substancje aplikowane były osobno czy łącznie oraz
- czy uzyskane efekty na poziomie komórkowym i biochemicznych mają charakter synergistyczny czy addytywny.
- ponadto połączyła aplikację solasoniny i solamarginy z fenitrothionem, dla którego określiła dawkę odpowiedzialną za LC₅₀ i LC₄₀ i zastosowała różne strategie aplikowania tych mieszanin larwom szkodnika.

Wykonane badania miały określić, czy ekstrakt z psianki czarnej można zastosować jako insektycyd oraz czy ma on wpływ na toksyczność fenitrothionu.

Rozprawę stanowi kompilacja trzech, spójnych tematycznie artykułów, dwa z nich opublikowano w roku 2018, a trzeci w roku 2020. Jeden z artykułów opublikowany w roku 2018 w Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety stanowi przegląd doczasowej wiedzy z zakresu insektycydów roślinnych stosowanych przeciwko szkodnikom magazynowym. Dwa kolejne artykuły są pracami oryginalnymi prezentującymi wyniki otrzymane przez Doktorantkę w ramach pracy zespołowej i zostały zamieszczone w czasopiśmie Toxins. Sumaryczny współczynnik oddziaływania tych prac (Impact Factor; IF) wynosi 16,974. Do dysertacji dołączono także oświadczenia współautorów, które jednoznacznie wskazują na dominującą rolę mgr Marty Spochacz w przygotowaniu załączonych publikacji oraz przeprowadzeniu części eksperymentalnej opisanych badań. Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich przedstawionych artykułach. W świetle przedstawionych danych, zestawienie tych prac tak, aby tworzyły rozprawę doktorską nie budzi moich wątpliwości. Prace stanowiące rozprawę, przed opublikowaniem w periodykach naukowych, podlegały wnikliwej i rygorystycznej recenzji (peer-review) specjalistów i edytorów naukowych i uzyskały ich pozytywne

opinie. Nie widzę zatem konieczności omawiania strony edytorskiej tych prac w dalszej części mojej oceny.

W skład rozprawy wchodzi

- krótkie Streszczenie w języku polskim i angielskim, oraz
- Wprowadzenie (w języku polskim) zawierające założone cztery cele rozprawy i krótkie omówienie uzyskanych wyników w ramach każdego celu,
- Podsumowanie oraz Bibliografia.

Załączony krótki wykaz literatury pochodzi z okresu 1990-2020. Większość prac dotyczących alkaloidów *Solanum nigrum* są publikowane 10 lat temu lub później. Wysoki poziom toksyczności badanych substancji praktycznie wyklucza je ze stosowania w ochronie przechowywanej żywności, szczególnie tej przeznaczonej do bezpośredniej konsumpcji. Natomiast innym aspektem jest potencjał badanych alkaloidów i możliwość wykorzystania ich jako naturalne insektycydy. Jednak warunkiem koniecznym dla ich szerszego zastosowania jest opracowanie warunków i zasad ich aplikowania z uwzględnieniem bezpieczeństwa konsumentów oraz owadów pożytecznych – w przypadku stosowania tych glikoalkaloidów w uprawach polowych. W związku z tym kieruję pytania do Doktorantki –

1) Czy posiada informacje dotyczące wpływu wyciągów roślinnych (nie tylko z psianki czarnej, ale także z innych roślin i z ich części) na owady pożyteczne?

Moje kolejne pytania dotyczą-

2) Jakimi przesłankami/podstawami naukowymi kierowała się Doktorantka podczas dokonywania wyboru ekstraktu z owoców psianki czarnej do badań z młynarkiem mącznikiem – szkodnikiem produktów przeznaczonych do bezpośredniej konsumpcji?

3) Podobne pytanie jak powyżej nasuwa mi się także w stosunku do wyboru fenitrotrionu, który jest przedstawicielem starszej grupy insektycydów (fosforoorganicznych), wykazuje bardzo wysoką toksyczność dla środowiska i organizmów nie będących przeznaczonych do zawalczenia - o czym Doktorantka wie i sama o tym wspomina w dysertacji - oraz, który jako jeden z pierwszych został wycofany z użycia w rolnictwie. Dlaczego wybrała do badań ten związek, a nie inny obecnie stosowany w ochronie i bezpieczniejszy dla środowiska i stosujących?

Analizując załączone prace oraz opracowane Wprowadzenie stwierdzam, że pomimo zastosowania skrótów w opisach badań oraz w częściowo przeplatających się ze sobą opisach wyników, Doktorantka w zasadzie prawidłowo zaplanowała i przeprowadziła badania na poziomie organizmu, komórkowym oraz biochemicznym. Zastosowała różne stężenia ekstraktu i strategie ich podawania owadom rozpoczynając od 1) oceny wpływu ekstraktu na owady, przechodząc do badań nad 2) porównaniem efektu aplikacji ekstraktu i czystych glikoalkaloidów, kontynuując badania wokół określenia dawki fenitrotrionu na poziomie LC_{50} i LC_{40} dla larw i oceny efektywności letalnej i subletalnej dla larw mącznika młynarka po zastosowaniu ustalonych dawek fenitrotrionu i ekstraktu. Chciałabym jednak w tym miejscu skierować kolejne pytania w celu wyjaśnienia moich wątpliwości

4) Doktorantka prowadziła badania na imago lub na larwach, dlaczego zatem nie uwzględniła we wszystkich etapach/celach swoich badań te same stadia larwalne

szkodnika oraz ten sam zakres badanych zmiennych? Mając na uwadze różne wrażliwości poszczególnych stadiów rozwojowych na substancje czynne zawarte w insektycydach lub stosowane substancje naturalne, trudno jest wnioskować, czy obserwowane zmiany komórkowe w wybranych tkankach lub zmiany biochemiczne są powtarzalne dla wszystkich stadiów rozwojowych mącznika młynarka. Czy w takim razie w podsumowaniu wyników, Doktorantka może odwoływać się do oceny wrażliwości całej populacji badanego szkodnika?

5) Dlaczego w etapie badań z fenitrotrionem zastosowano ekstrakt, a nie czyste glikoalkaloidy? Poproszę o doprecyzowanie, czy było to spowodowane łatwością zastosowania ekstraktu oraz wykazaniem synergistycznego działania badanych substancji?

6) Poproszę także o wyjaśnienie - Czy obserwowane zmiany na poziomie organizmu, komórki lub zmiany biochemiczne nie mogły być spowodowane zastosowaniem 70% etanolu jako rozpuszczalnika dla fenitrotrionu? Oprócz danych dla populacji kontrolnej nie znalazłam wyników dotyczących wpływu rozpuszczalnika na obserwowane cechy.

Opracowanie strategii aplikowania ekstraktu o danym stężeniu na 24 godziny przed podaniem fenitrotrionu w dawce obniżonej (LC_{40}) powodującej wzrost śmiertelności larw i nasilenie subletalnych efektów uważam za podejście nowatorskie i bardzo interesujące dla badań wdrożeniowych. Inną kwestią do rozwiązania w kolejnych być może badaniach, byłoby wyjaśnienie, dlaczego podanie fenitrotrionu w mieszaninie z ekstraktem nie wykazuje już synergistycznego efektu widocznego we wzroście śmiertelności, a jedynie efekty subletalne obserwowane na poziomie komórkowym. Chciałabym także poprosić o doprecyzowanie, które z zastosowanych czterech (0,01; 0,1; 1; 10%) stężeń ekstraktu było najbardziej efektywne.

Zaletą przedstawionej pracy przemawiającą za potwierdzeniem warsztatu badawczego Doktorantki jest także umiejętność zaprojektowania kolejnych badań w oparciu o wyniki, które niestety nie potwierdziły wcześniej założonej hipotezy badawczej - tak jak wystąpiło to w przypadku strategii równoczesnego podania ekstraktu i fenitrotrionu. Świadczy to o dojrzałości badawczej Doktorantki, która potrafi kontynuować badania i modyfikować ich schemat.

Uważam, że Doktorantka opierając się na zdobytej wiedzy jest przygotowana, aby kontynuować badania uwzględniając jednak mniej toksyczne substancje naturalne i aktualnie zarejestrowane i stosowane insektycydy w celu łączenia ich i poszukiwania synergistycznych efektów subletalnych lub letalnych dla owadów szkodliwych. Wówczas stwierdzenia, które zamieściła w podsumowaniu dotyczące wykorzystania substancji o pochodzeniu roślinnym jako bezpiecznych i tańszych metod/środków ochrony roślin nabrałyby bardziej realnych podstaw.

Moje wątpliwości dotyczące wyboru zarówno tego konkretnego ekstraktu, jak i łączenia jego z fenitrotrionem nie przeczą jednakże potwierdzonym umiejętnościom Doktorantki związanym z zaplanowaniem i przeprowadzeniem doświadczeń oraz zinterpretowaniem otrzymanych wyników i ich upowszechnienia w publikacjach o międzynarodowym zasięgu. Przedłożona dysertacja świadczy o opanowaniu przez Doktorantkę warsztatu pracy naukowej. Oceniana rozprawa dotyczy badań podstawowych, stanowiących podstawę dla dalszych badań aplikacyjnych.

Analizując dysertację Pani mgr M. Spochacz chciałabym zwrócić uwagę na jedną z trzech prac składających się na dysertację. Jest to praca przeglądowa, nie będąca *sensu stricto* pracą oryginalną, badawczą, aczkolwiek Doktorantce udało się wkomponować niewielki fragment dotyczący Jej badań. Wspomniana praca jest potwierdzeniem umiejętności Doktorantki przygotowania obszernych prac naukowych i łączenia zebranych materiałów dotychczasowej wiedzy w ramach konkretnego zagadnienia badawczego.

W podsumowaniu chcę stwierdzić, że przedstawione badania reprezentują interesujący obszar badawczy związany z poszukiwaniem alternatywnych metod zwalczania owadów szkodliwych i wykorzystaniu substancji pochodzenia roślinnego stosowanych samodzielnie lub w połączeniu z substancjami chemicznymi. Bardzo dobrze ten obszar badawczy komponuje się z założonymi strategiami rozwoju rolnictwa w Europie. Zastosowanie strategii łączenia kilku substancji oraz opracowanie zasad efektywnego ich stosowania świadczy o znajomości podstaw badań aplikacyjnych, a zamieszczone wyniki badań dotyczących zmian fizjologicznych i biochemicznych świadczą o umiejętności prowadzenia badań podstawowych.

Zaangażowanie i zakres prowadzonych badań przez Doktorantkę zostało docenione poprzez przyznanie Jej podczas studiów doktoranckich wsparcia finansowego w ramach programu „Paszport dla przyszłości – interdyscyplinarne studia doktoranckie Wydziału Biologii UAM POWR.03.02.00-00-1006/17” w ramach grantu Wydziału Biologii w roku 2017.

Na zakończenie chciałabym jeszcze wspomnieć, że Doktorantce nie udało się uniknąć kilku błędów stylistycznych lub interpunkcyjnych. Wspomnę jedynie o wyrażeniu „hodowane rośliny” i „emisja szkodliwych pestycydów”. O hodowli mówimy jedynie w przypadku hodowli zwierząt lub prac nad nowymi odmianami roślin, natomiast w przypadku pestycydów zazwyczaj stosujemy pojęcie, po prostu, „stosowanie” lub „aplikacja”. Oczywiście, te uwagi nie umniejszają wartości przedłożonej dysertacji.

Uważam, że oceniana praca spełnia wszystkie wymogi formalne, zawarte w art. 13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789), stawiane rozprawom doktorskim. Zatem zwracam się o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Marty Spochacz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wartość poznawczą przeprowadzonych badań oraz opublikowanie ich w uznanych periodykach naukowych, przedkładam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Prof. IOR-PIB dr hab. Jolanta Kowalska
Poznań, 08.01.2021 r.

