INSTYTUT OCHRONY ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
Zakład Rolnictwa Ekologicznego i Ochrony Środowiska

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Anetty Lewandowskiej-Wosik
pt. "Efekty działania nikotyny i acetamiprydu na *Drosophila melanogaster* i *Drosophila suzukii*"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani magister Anetty Lewandowskiej-Wosik, wykonana została pod kierunkiem Pani prof. UAM dr hab. Ewy Chudzińskiej, na Wydziale Biologii, w Instytucie Biologii Eksperymentalnej, w Zakładzie Genetyki Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Rozprawa dotyczy określenia skutków długotrwałego stresu wywołanego kontaktem z subletalnymi dawkami nikotyny (N) i acetamiprydu (ACM) na przykładzie dwóch gatunków owadów modelowych, *Drosophila melanogaster* i *Drosophila suzuki.* Mając na uwadze, że Doktorantka odwołuje się do bezpiecznego stosowania insektycydów nie mających skutków ubocznych na organizmy niebędące celem zabiegu ochronnego zagadnienia jest ważne. Natomiast należy wspomnieć, że obie substancje czynne zaliczają się do insektycydów z grupy neonikotynoidów, a ta grupa środków ochrony roślin z uwagi na ich udowodniony szkodliwy efekt dla pszczół i długotrwale zaleganie w środowisku jest aktualnie stopniowo wycofywana z użycia, a nikotyna nie jest już od kilkunastu lat dozwolona w ochronie roślin.

W przedłożonej rozprawie doktorskiej, ramach jednego celu głównego sformułowano cele szczegółowe takie jak;

- Poprzez wywołane zmiany behawioralne, na poziomie organizmu oraz na poziomie komórkowym zbadanie skutków działania testowanych substancji czynnych, na przykładzie dwóch gatunków Drosophila sp.,
- W zależności od spokrewnienia filogenetycznego owadów porównanie efektów długotrwałej ekspozycji na testowane dwie substancje czynne,

ul. Władysława Węgorka 20
60-318 Poznań
www.ior.poznan.pl

Centrala 61 864 90 00
Sekretariat 61 864 90 05; 61 864 90 06
sekretariat@iorpib.poznan.pl

KONTO BNP Paribas Bank Polska S.A. O/Poznań
Nr 63 2030 0045 1110 0000 0042 1600
NIP 7770002702

- Weryfikacja hipotezy badawczej, że wielopokoleniowa ekspozycja owadów na substancje czynne wykształci u nich odporność na testowane substancje czynne.

Rozprawę stanowi kompilacja dwóch opublikowanych prac o łącznym IF – 8,9 i łącznej liczbie punktów 200 MNiSW, oba manuskrypty opublikowano w roku 2024, pierwszy w *Ecotoxicology and Environmental Safety,* drugi w *Insects*. Oba wydawnictwa należą do platformy wydawniczej mdpi. Prace stanowią spójny tematycznie blok badań koncentrujących się wokół tematu rozprawy. Doktorantka jest w obu pracach autorem wiodącym i korespondencyjnym. Do opublikowanych prac załączono oświadczenia współautorów o ich udziale i realizowanych zadaniach w omawianych pracach.

Pozostałe prace z dorobku Doktorantki (sztuk 5), wszystkie prace są pracami zespołowymi, ich data publikacji zawiera się w przedziale od 2015-2024r, suma punktów MNiSW to 385, a sumaryczny IF to 7,848. Poza tym wykazano współautorstwo 5 rozdziałów w monografiach, 19 popularnonaukowych artykułów oraz udział w 19 konferencjach, w tym kilkunastu międzynarodowych. W ramach przedstawienia sylwetki Doktorantki umieszczono dane informujące o ukończeniu w roku 2004 studiów magisterskich na wydziale Biologii UAM, a w roku 2007 studiów podyplomowych na Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie.

Ocena merytoryczna rozprawy

Rozprawa opiera się na dwóch już opublikowanych manuskryptach, które przeszły proces recenzji wydawniczych dlatego w niniejszej recenzji nie będę się odnosić do ich założeń metodycznych oraz otrzymanych wniosków. Chciałabym natomiast odnieść się do zwięzłego opisu wykonanych prac i podsumowania, które jest zamieszczone jedynie na 13 stronach. W rozprawie zamieszczono 3 wykresy, 1 schemat i 2 zdjęcia, przy czym wszystkie oznaczono jako rysunki.

Podstawowe założenie badawcze zakłada, że kolejne pokolenia Drosophila sp. będą wykazywać zmniejszony poziom stresu w wyniku nabywania odporności na czynniki stresowe – nikotynę i acetamipryd. W zadaniach badawczych, które dotyczą weryfikacji tej hipotezy wymieniono konieczne do przeprowadzenie testy skuteczności insektycydów oraz ustalenia ich dawek subletalnych, ale także wspomniano o

standaryzacji zasad i prowadzeniu hodowli muszek, co w mojej opinii jest zadaniem technicznym i nie kwalifikuje się jako zadanie badawcze.

Opis badań jest dość lakoniczny, dlatego poproszę o uszczegółowienie, czy stosowano czystą substancję czynną, czy w produkcie handlowym (insektycyd zawierający acetamipryd) oraz jakie konkretnie podłoża były modyfikowane i w jaki sposób zastosowano je w celu określenie stopnia przeżycia jaj. Poproszę także o informacje, dlaczego w testach zastosowania jaja, a nie młode formy larwalne lub formy dorosłe. Z opisu wynika bowiem, że to właśnie jaja miały bezpośredni kontakt ze zmodyfikowanym podłożem.

W związku z testami dotyczącymi narażenia różnych stadiów rozwojowych owadów (jaja, trzecie stadium larwalne) na czynniki stresu poproszę o doprecyzowanie, czy w badaniach dotyczących przeżywalności jaj zastosowano kontrolę zerową, czyli bez czynnika stresu, w opisie wymieniono jedynie stężenia do 0,125 do 1mikrograma/ml dla ACM i od 0,05 do 0,5 mikrograma/ml dla N.

Neonikotynoidy są neurotoksynami, czyli toksynami działającymi na układ nerwowy, a konkretnie na receptory w błonach komórkowych. Umożliwiają one przepływ bodźców (informacji) w układzie nerwowym. Neonikotynoidy łatwo wiążąc się z receptorami blokują je i powodują paraliż i śmierć owada. Poproszę o wyjaśnienie, dlaczego zastosowano je w odniesieniu do jaj i dlaczego testowano jedynie jedną drogę kontaktu owada z czynnikiem stresu, czyli poprzez kontakt z pożywką, a nie np. poprzez kontakt wziewny lub inną metodę – to jest insektycyd systemiczny, zatem można podawać z pokarmem.

Ponieważ neonikotynoidy są neurotoksynami badania z neuroblastami są interesujące, przy czym Doktorantka wykazała, że gatunek *D. suzukii* jest bardziej wrażliwy. Szczegółowe badania dotyczące neuroblastów i prowadzonych testów sprawności lokomocyjnych zawarto w publikacji nr 1.

Druga publikacja dotyczy asymetrii fluktuacyjnej (FA) użyłkowania skrzydeł, która może być uznana jako miernik stresu u owada modelowego. W tym przypadku *D. melanogaster* okazała się bardziej wrażliwa na stosowaną nikotynę i acetamipryd. Ponadto zaobserwowano, że wraz ze wzrostem czynnika stresu (w tym przypadku stężeń insektycydów) wartość wskaźnika FA nie zmienia się. W dysertacji nie umieszczono wniosków, co z pewnością znacznie lepiej uwypukliłoby wartość

opisanych badań, zamieszczono jedynie opisowe podsumowanie (natomiast w publikacji nr 2 takie wnioski zawarto).

Podsumowując Doktorantka wykazała pozytywnie zweryfikowaną hipotezę badawczą o subletalnych dawkach i ich długotrwałych efektach komórkowych w populacji obejmującej 10 pokoleń owadów modelowych. Ponadto wykazała, że mechanizm nabywania odporności na dwie testowane substancje czynne nie jest identyczny dla owadów blisko spokrewnionych. Ponadto, wykazała że zmiany behawioralne (test lokomocji) nie jest właściwym miernikiem do oceny wpływu długotrwałego narażenia obu gatunków owadów na czynnik stresu.

Ocena poprawności struktury i strony edytorskiej rozprawy

Rozprawa zawiera:

- wykaz oryginalnych prac
- wykaz skrótów użytych w rozprawie – niestety z jedną literówką, nie wyjaśnionymi pojęciami angielskimi (OTM), nie precyzyjnie zastosowaną terminologią polską (SPD50 – należy doprecyzować, że chodzi o 50% testowanej populacji, LC50 – pojęcie „medialne stężenie śmiertelne" nie jest poprawne) lub naprzemiennie stosowanymi w języku polskim i angielskim (np. *Drosophila* plamoskrzydła, powinno być muszka plamoskrzydła)
- streszczenie i słowa kluczowe w języku polskim i angielskim,
- wstęp,
- wprowadzenie
- główne cele rozprawy
- uzyskane wyniki
- podsumowanie.

Cały blok merytoryczny zamyka wykaz bibliografii zawierający 54 pozycji.

Opis dysertacji jest przedstawiony w dużym uogólnieniu, nie odniesiono się do żadnych metod statystycznych, które jednak zostały wymienione w publikacjach. Doktorantka powinna w przyszłości poświecić więcej czasu na przedstawienie swojej aktywności i uzyskanych wyników w odniesieniu do aktualnej wiedzy i wykazania

nowości w dyskusji, której tutaj zabrakło, podobnie jak konkretnie sformułowanych wyników. Strona edytorska rozprawy jest poprawna, aczkolwiek Doktorantka nie uchroniła się przed nieścisłościami terminologicznymi i kolokwialnymi sformułowaniami (np. „Szybki rozwój rolnictwa wymusza produkcję szerokiej gamy różnych pestycydów" lub „Obecnie szeroko stosowane w ochronie roślin są neonikotynoidy" lub „jako insektycyd neonikotynoidowy z grupy cyjanoamidyniwej nie jest klasyfikowany jako toksyczny dla pszczół"). Każda etykieta środka ochrony zawierającego acetamipryd zawiera zapis „Zaleca się stosować środek poza okresami aktywności pszczół oraz innych owadów zapylających". Ponadto, tak jak już podałam, nikotyna nie jest dozwoloną substancją czynną w ochronie, podobnie jak acetamipryd nie jest dozwolony w Polsce do zwalczania muszki plamoskrzydłej, tak jak podano w dysertacji.

Wniosek końcowy

Pomimo moich komentarzy dotyczących skromności opisu i braku, wg mojej opinii, wyartykułowania elementu nowości prowadzonych badań w odniesieniu do opisów mechanizmów nabywania odporności owadów na insektycydy uważam, że przedłożona dysertacja jest jedynie pewnym etapem w planowanych dalszych testów dotyczących mechanizmu nabywania odporności, a taki mechanizm jest już opisany w ochronie roślin. Zatem dopiero kolejne badania w oparciu na analizy genetyczne i ekspresję enzymatyczną mogłyby być podstawą do opracowywania założeń bezpiecznego i efektownego zwalczania owadów szkodliwych uwzględniając aktualnie stosowane insektycydy i kolejne modele badawcze. Biorąc po uwagę umiejętność przeprowadzenia badań podstawowych wykazaną w publikacjach przez Doktorantkę mam nadzieję, że badania tak ważne dla obszaru produkcji rozlicznej będą przez Nią kontynuowane i pogłębiane z elementem nowości.

W oparciu o załączone i opublikowane prace i pomimo moich wątpliwości w doborze modelu badawczego i metodyki, uważam, że Doktorantka posiada umiejętność prowadzenia samodzielnych badań, umiejętność pracy zespołowej i opanowała warsztat pracy naukowej. Nabyła także doświadczenie do prezentowania wyników na gremiach konferencyjnych. Oceniana rozprawa pozwala na uznanie

ogólnej wiedzy teoretycznej Doktorantki i Jej umiejętności do samodzielnego prowadzenia i kontynuowania pracy naukowej.

Uważam, że przedłożona dysertacja spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki stawiane rozprawom doktorskim. Zatem zwracam się o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Anetty Lewandowskiej-Wosik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Jolanta Kowalska

Poznań, 13.11. 2024 r.

ul. Władysława Węgorka 20
60-318 Poznań
www.ior.poznan.pl

Centrala 61 864 90 00
Sekretariat 61 864 90 05; 61 864 90 06
sekretariat@iorpib.poznan.pl

KONTO BNP Paribas Bank Polska S.A. O/Poznań
Nr 63 2030 0045 1110 0000 0042 1600
NIP 7770002702