

Lublin, dn. 28.11.2017r.

Dr hab. Aneta Strachecka
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Wydział Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki
Zakład Biologii Środowiskowej i Apidologii
ul. Akademicka 13
20-950 Lublin

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Ewy Zaobidnej pt. „**Zmiany w szlaku sygnałowym Toll w odpowiedzi pszczoły miodnej *Apis mellifera carnica* na zarażenie *Varroa destructor***”
przygotowanej pod kierunkiem Promotora – prof. dr hab. Krystyny Żółtowskiej
i Promotora pomocniczego dr Elżbiety Łopieńskiej-Biernat.

Podstawą wydania opinii jest pismo prof. dr hab. Tadeusza Kamińskiego – Dziekana Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 25 października 2017r. (WBiB-DZ.6350.3.2014).

Mgr Ewa Zaobidna przedstawiła do oceny pracę doktorską, składającą się z trzech powiązanych tematycznie prac oryginalnych, opublikowanych w latach 2015-2017, w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (JCR) posiadających IF – 0.571 (w 2015r.) i 0.722 (w 2016/2017r.) dla *Journal of Apicultural Science* oraz 1.160 (w 2016/2017r.) dla *Acta Parasitologica*. Przedstawione prace są trój-autorskie (Doktorantka i Promotorzy), a mgr Ewa Zaobidna jest pierwszym i jednocześnie korespondencyjnym autorem. Według oświadczeń Pani mgr Ewy Zaobidnej, Jej udział w przygotowaniu tych publikacji był znaczny i polegał na opracowaniu koncepcji i hipotez, planowaniu badań i udziale w ich realizacji, interpretacji i opracowaniu wyników oraz na przygotowaniu prac do druku. Przytoczone informacje świadczą o wnikliwej znajomości problematyki badawczej i o dobrym przygotowaniu Autorki do podjęcia niniejszych badań, również pod względem analitycznym. Doktorantka nie określiła jednak swojego procentowego udziału w powstanie publikacji. Po przedłożonych oświadczeniach wszystkich autorów mogę wnioskować, iż udział mgr Ewy Zaobidnej w powstanie tych publikacji był powyżej 80%. Sumaryczny *Impact Factor* prac wchodzących w skład dysertacji doktorskiej wynosi 2.453 (według roku publikacji, z tym że dla publikacji z 2017 roku posłużono się IF dla roku 2016), a łączna liczba punktów według wykazu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego wynosi 70. Warto podkreślić, że publikacja w *Journal of Apicultural Science* z 2015 roku ma już 3 cytowania (*Web of Science* z dn. 28.11.2017r.), co świadczy o ważności badań podjętych przez Doktorantkę. Sądzę, że dwie pozostałe prace opublikowane w 2017 roku równie szybko zyskają uznanie w środowisku naukowym zgłębiającym tematykę pszczół.

Wszystkie publikacje składające się na dysertację doktorską ukazały się w recenzowanych czasopismach naukowych, w których już wcześniej redakcje czasopism i recenzenci dokonali ich oceny merytorycznej.

Zbiór trzech publikacji jest poprzedzony wprowadzeniem w języku polskim, który składa się z następujących rozdziałów: Streszczenie (w języku polskim i angielskim), Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Realizacja zadań pracy doktorskiej, Podsumowanie, Wnioski i Piśmiennictwo. Publikacje wraz ze zwięzłym wprowadzeniem, omówieniem i podsumowaniem stanowią istotę nowoczesnej rozprawy doktorskiej wpisującej się w standardy światowych instytucji naukowych z zakresu nauk przyrodniczych (w tym biologicznych) i ścisłych. Wartym podkreślenia jest fakt, iż wyniki do niniejszych publikacji zostały sfinansowane z: 1) projektu badawczego Preludium (2013/11/N/NZ9/00053) Narodowego Centrum Nauki, w którym Doktorantka była kierownikiem oraz 2) ze źródeł, w ramach konkursu na finansowanie działalności polegającej na prowadzeniu badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich (2012r. – 528-0209.0881; 2013r. - 528-0209.0882; 2014r. - 528-0209.0883; 2015r. - 528-0209.0884). Uważam to za wyróżnienie i prestiż dla tak młodej osoby, która dopiero rozpoczyna swoją karierę naukową. Świadczy to również o wnikliwej znajomości problematyki i tematów „na czasie” oraz o dobrym przygotowaniu metodycznym/analitycznym.

Badania naukowe pokazują wyraźne nasilenie wielu różnych czynników chorobotwórczych w rodzinach pszczelich, które powodują zmniejszanie populacji pszczół na całym świecie. Jedną z przyczyn tego zjawiska, nazywanego zespołem masowego giniecia pszczół (*colony collapse disorder* – CCD), jest inwazja ektopasożyta *Varroa destructor*. Skutki jego inwazji nasilają się w dobie spadku odporności pszczół, za co z kolei odpowiadają coraz częściej czynniki antropogeniczne. Zagrożeniem jest chemizacja rolnictwa, która poprzez rosnące skażenia gleby i powietrza zwiększa presję substancji toksycznych, obniżających pszczelą odporność. Ponadto, jakościowe ubożenie szaty roślinnej wskutek wzrostu arealów monokultur oraz spadku kwiecistości terenów zielonych i przydomowych, skutkują zubożeniem diety pszczół, co jeszcze bardziej osłabia ich metabolizm i odporność. Ponadto współczesne metody gospodarki pasiecznej, np. gospodarka wędrowną, narażają pszczoły na stres. Szczególnie destrukcyjnie na organizm pszczoły działają powszechnie stosowane leki przeciw warrozie, których stosowania nie można dziś uniknąć. Te i inne czynniki są przyczyną, dla której powinno się zgłębiać i szczegółowo analizować elementy układu odpornościowego pszczół, co też uczyniła Doktorantka w swojej dysertacji. Mgr Ewa Zaobidna określiła wpływ naturalnego zarażenia *V. destructor* na ekspresję 16 genów ważnych w humoralnej odpowiedzi immunologicznej w pięciu stadiach rozwojowych robotnic i trutni *A. mellifera carnica*: 14 genów szlaku Toll, w tym genów efektorowych 4 peptydów przeciwbakteryjnych (AMPs), genu profenolooksydazy (proPO) i lizozymu oraz aktywności fenolooksydazy i lizozymu. Na uwagę zasługuje fakt, iż materiał pochodził z tych samych rodzin pszczelich, co pozwoliło zredukować do niezbędnego minimum wpływ czynników genetycznych i środowiskowych na stan układu immunologicznego pszczół. Ponadto, Doktorantka wykorzystywała w badaniach czerw zarażony tą samą liczbą roztoczy (2 sztuki) by wyeliminować różnice wynikające z różnej intensywności zarażenia na zmiany ekspresji genów i aktywności enzymów. Ustawienie w ten sposób doświadczenia pozwoliło na uzyskanie wyników w warunkach naturalnego zarażenia *V. destructor*, a nie tylko w warunkach laboratoryjnych, jak czynili to inni autorzy (np. Gregorc i in., 2012, J. Insect

Sci.; Kuster i in., 2014, J. Exp. Biol.). *Novum* tej dysertacji jest przedstawienie zmian w ekspresji ww. genów oraz aktywności fenolooksydazy i lizozymu u poszczególnych stadiów rozwojowych trutni, a nie tylko u robotnic (jak opisywano to do tej pory w publikacjach innych badaczy).

We Wstępie, który jednocześnie jest przeglądem literatury, Doktorantka scharakteryzowała strukturę rodziny pszczelej, cykl rozwojowy robotnic i trutni, haplotypy i cykl rozwojowy *V. destructor* oraz patogenезę choroby na poziomie indywidualnym i rodziny pszczelej. Ponadto, szczegółowo opisała odporność owadów, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów na poziomie indywidualnym u pszczół, a wśród nich tych, które badała w pracy.

Hipotezy badawcze, oprócz celów, wydają się stanowić najważniejszy punkt odniesienia w dokonaniu oceny wartości naukowej pracy. Moim zdaniem, hipotezy przedstawione w każdej z trzech publikacji są bardziej szczegółowe, niż te w opracowaniu w języku polskim. Nie umniejsza to jednak wartości pracy, ponieważ to właśnie publikacje stanowią główną część rozprawy doktorskiej i są podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora. Uważam, iż w kontekście problemu badawczego i celów rozprawy, hipotezy tych publikacji są powiązane ze sobą logicznie. Wyraźnie wytyczyły kierunek badań, a ich empiryczna weryfikacja umożliwiła mgr Ewie Zaobidnej realizację założonych celów.

Z rozdziałów „Materiały i metody” w publikacjach wynika, że Doktorantka podzieliła doświadczenie na część pasieczną, którą prowadziła w 2013 roku, oraz część laboratoryjną, która przebiegała w kolejnych miesiącach po pobraniu materiału. Szczególną uwagę należy zwrócić na żmudny i niezwykle pracochłonny moment pobierania materiału – nie jest proste odszukanie określonego stadium rozwojowego robotnic lub trutni zarażonych dwoma roztocznymi. Metody molekularne i biochemiczne zastosowane w badaniach zostały przemyślane i właściwie dobrane. Liczba przeprowadzonych analiz świadczy o wielkim wyzwaniu jakiego podjęła się Doktorantka. Wymagało to od Niej ogromnego nakładu pracy i determinacji oraz takich cech jak dokładność, sumienność i staranność podczas wykonywanych prac. Rezultatem tych wszystkich analiz są wyniki przedstawione w tabelach i na rycinach w poszczególnych publikacjach. W opracowaniu w języku polskim, Doktorantka skupiła się na scharakteryzowaniu najważniejszych z nich. Na podstawie badań wyciągnięto 3 trafne, prawidłowo sformułowane wnioski, z których moim zdaniem szczególne znaczenie pod względem praktycznym ma wniosek nr 3: „Wraz z wiekiem rozwijającego się czerwia pszczelego dochodzi u zarażonych osobników do osłabienia odpowiedzi immunologicznej...”. Należy podkreślić, że inne, moim zdaniem równie ważne wnioski, również o charakterze aplikacyjnym zostały zawarte w publikacjach (np. w *Acta Parasitologica* – o wykorzystaniu metod molekularnych w diagnozowaniu i profilaktyce warrozy).

W literaturze polskiej brakuje opracowania na temat wpływu *V. destructor* na pszczoły. Dlatego zachęcam Doktorantkę, aby po drobnym przeredagowaniu, uściśleniu i uzupełnieniu niektórych podrozdziałów, opublikowała Wstęp swojej dysertacji, właśnie w ojczystym języku. Zdaję sobie sprawę, iż takie publikacje są nisko-punktowe, ale należy pamiętać, iż przywilejem i jednocześnie obowiązkiem naukowca jest popularyzacja wiedzy. Będzie to nie tylko dobra lektura dla naukowców zajmujących się tą tematyką, ale również

dla pszczelarzy-praktyków. Mając to na uwadze, proponuję uwzględnić i ustosunkować się do poniższych uwag i wskazówek:

- w pracy pojawiają się nietrafne sformułowania, literówki, błędy w interpunkcji i stylistyce, np. na str. 5, 9-17, 19-21, które naniesiono bezpośrednio w egzemplarzu pracy. Poprawiony egzemplarz przekazałam Doktorantce.

- W podrozdziale „Pszczola miodna” Doktorantka pisze: „W każdej rodzinie jest tylko jedna królowa. Resztę kolonii stanowią jej córki – robotnice”. Proszę aby Autorka wyjaśniła: 1) czy istnieje sytuacja w rodzinie pszczelej kiedy są dwie matki? 2) czy zawsze w rodzinie pszczelej znajdują się córki matki? – czy istnieje inny stosunek pokrewieństwa?

W tym samym podrozdziale Doktorantka pisze: „Robotnice żyją do 40 dni w okresie letnim i 140 dni w okresie zimowym”. Proszę o wyjaśnienie: 1) Czy znane są przypadki dłuższego życia robotnic? 2) Czy znane są sytuacje w rodzinie pszczelej, kiedy robotnice wydłużają swoje życie?

- Doktorantka wspomniała na str. 13 o nabywaniu oporności na akarycydy przez *V. destructor*. Czy mogłaby Doktorantka krótko scharakteryzować mechanizmy nabywania oporności na chemioterapeutyki przez tego roztocza?

- na str. 20 napisano: „Ostatnio wykazano możliwość współdziałania rozszerzającego spektrum działania dwóch AMPs – abycyny i hymenoptecyny w stosunku do bakterii G-. Można sądzić, że zjawisko porozumiewania się poszczególnych elementów układu odpornościowego nie ogranicza się tylko do tych dwóch AMPs, ale jest bardziej powszechne.” Co miała na myśli Doktorantka, używając sformułowania „porozumiewania się” w kontekście tych związków?

- Proszę o wyjaśnienie, w jaki sposób fenolooksydaza powiązana jest z melanizacją i tworzeniem guzków melanotycznych? Ponieważ w podrozdziale „Proces melanizacji w odpowiedzi immunologicznej owadów” brakuje tych informacji.

Wyżej wymienione uwagi i sugestie nie umniejszają wartości merytorycznej niniejszej dysertacji oraz bardzo wysokiej oceny, jaką z pełną odpowiedzialnością stawiam pracy doktorskiej Pani mgr Ewy Zaobidnej.

W świetle wszystkich powyższych argumentów stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji dysertacja doktorska Pani mgr Ewy Zaobidnej spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określonym w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003r. (Dz. U. z 2003r nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr Ewy Zaobidnej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Praca charakteryzuje się dużą wartością poznawczą, nowatorskim charakterem i szerokim zakresem badań. Świadczy to o dużej samodzielności naukowej i badawczej Doktorantki, swobodzie poruszania się w zagadnieniach genetycznych, biochemicznych i analitycznych, a także o jej pracowitości i rzetelności badawczej.

Biorąc pod uwagę powyższe przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Biotechnologii wniosek o wyróżnienie niniejszej dysertacji doktorskiej stosowną nagrodą.

Ameta Strachecka