



dr Aneta A. Ptaszyńska

**Nowe metody identyfikacji *Nosema apis* i *Nosema ceranae*
oraz wpływ nosemozy na mikroorganizmy jelitowe pszczoły miodnej**

Załącznik 2

Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych
w języku polskim

Lublin, 2017

Spis treści

I.	Posiadane dyplomy i stopnie naukowe	3
1.	Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych (Tab. 1)	3
II.	Tytuł osiągnięcia naukowego	4
III.	Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego	5
IV.	Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników	6
1.	Wprowadzenie	6
2.	Opis osiągnięcia naukowego.....	9
3.	Podsumowanie najważniejszych osiągnięć:.....	16
V.	Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze	20
1.	Praca naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora.....	20
a.	Studia i praca magisterska.....	20
b.	Studia doktoranckie i doktorat	20
c.	Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze.....	23
2.	Praca naukowa po uzyskaniu stopnia doktora.....	23
a.	Zróznicowanie genetyczne starca wielkolistnego (<i>Senecio macrophyllus</i> M. Bieb.) .	23
b.	Grzyby mikroskopijne zasiedlające mszaki	24
c.	Nosemoza pszczoły miodnej.....	25
d.	Poszukiwanie nowych metod eradykacji nosemozy	27
3.	Udział w części eksperymentalnej innych badań.....	29
a.	Nowoczesne metody obrazowania próbek biologicznych przy zastosowaniu skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM).....	29
b.	Analiza filogenetyczna.....	30
4.	Zgłoszenia patentowe.....	31
5.	Inne realizowane obecnie zadania badawcze	31
6.	Plany badawcze.....	31
VI.	Podsumowanie aktywności naukowej	32

I. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

Tytuł magistra – Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie: Wydział Biologii i Biotechnologii), Lublin 1999 r.

kierunek: biotechnologia, specjalność: biotechnologia;

doświadczalna część pracy wykonana w Pracowni Mutagenazy i Reperacji DNA, Państwowej Akademii Nauk w Warszawie.

Tytuł pracy magisterskiej:

„Badanie udziału produktu genu *UMP1 (DIN8)* w odpowiedzi *Saccharomyces cerevisiae* na uszkodzenia DNA”

Promotor: prof. dr hab. Magdalena Fikus.

Stopień doktora – Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie: Wydział Biologii i Biotechnologii), Lublin 2007 r.

dziedzina: nauki biologiczne, dyscyplina: biologia

Tytuł rozprawy doktorskiej:

„Zastosowanie metod biotechnologicznych w badaniach nad pędrusiami (*Apionidae: Curculionoidea*)”

promotor: dr hab. Jacek Łętowski, prof. UMCS

1. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych (Tab. 1)

Miejsce pracy: Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii (do 2011 roku: Wydział Biologii i Nauk o Ziemi).

Tabela 1. Przebieg dotychczasowego zatrudniania w jednostkach naukowych

02.2007 – 09.2007	wykładowca (asystent) w Zakładzie Ekologii UMCS
11.2013 – 02.2014	specjalista w zakresie grzybowych chorób pszczół w Katedrze Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej UP w Lublinie, w ramach realizacji projektu badawczego nr: POIG.01.03.01-06-047/12, pt.: „Nowy środek biobójczy z funkcją blokowania cyklu rozrodczego <i>Varroa destructor</i> od walki z warrozą pszczoły miodnej”
10.2007 – obecnie	adiunkt w Zakładzie Botaniki i Mykologii UMCS

II. Tytuł osiągnięcia naukowego

Wskazanie osiągnięcia naukowego 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., Dz. U. 2005 nr 164, poz. 1365, art. 251; Dz. U. 2011, nr 84, poz. 455).

Osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl sześciu publikacji pod wspólnym tytułem:

Nowe metody identyfikacji *Nosema apis* i *Nosema ceranae* oraz wpływ nosemozy na mikroorganizmy jelitowe pszczoły miodnej

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe stanowi cykl **pięciu oryginalnych publikacji naukowych** oraz **jedna praca przeglądowa**, których sumaryczny *impact factor* (IF), podany zgodnie z rokiem ukazania się publikacji, wynosi: **11,039** (sumaryczny pięcioletni IF w/w publikacji wynosi **10,446**).

Suma punktów MNiSW podana zgodnie z aktualnym ujednoliconym wykazem czasopism punktowanych z **grudnia 2016 roku** wynosi **150 pkt**, zaś wg. wykazów obowiązujących w roku opublikowania wynosi **155 pkt**.

Prace badawcze wchodzące w skład osiągnięcia naukowego były w części finansowane ze środków przyznanych w latach 2014, 2015, 2016 w ramach indywidualnego dofinansowania badań przez Prorektora UMCS ds. Nauki i Współpracy Międzynarodowej oraz w ramach badań własnych i statutowych Zakładu Botaniki i Mykologii UMCS.

III. Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego

Tab. 2. Dane bibliograficzne publikacji wchodzących w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego

Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF ^a	IF _{5lat}	Punkty MNiSW ^b	Punkty MNiSW ²⁰¹⁶
P1	Ptaszyńska A.A.* , Mułenko W. 2013. Wybrane aspekty budowy, taksonomii oraz biologii rozwoju mikrosporydiów z rodzaju <i>Nosema</i> . (Selected aspects of the structure, development, taxonomy and biology of microsporidian parasites belonging to the genus <i>Nosema</i>). Medycyna Weterynaryjna (Veterinary Medicine – Science and Practice), 69, 716-726.	0,220	0,162	15	15
P2	Ptaszyńska A.A.* , Borsuk G., Woźniakowski G., Gnat S., Małek W. 2014. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection and differentiation of <i>Nosema apis</i> and <i>N. ceranae</i> in honeybees. FEMS Microbiology Letters, 357, 40–48, doi: 10.1111/1574-6968.12521.	2,723	2,166	25	20
P3	Ptaszyńska A.A.* , Borsuk G., Mułenko W., Demetraki-Paleolog J. 2014. Differentiation of <i>Nosema apis</i> and <i>Nosema ceranae</i> spores under Scanning Electron Microscopy (SEM). Journal of Apicultural Research, 53, 537-544, doi: 10.3896/IBRA.1.53.5.02	1,926	2,003	35	35
P4	Borsuk G. [#] , Ptaszyńska A.A.* , Olszewski K., Paleolog J. 2013. Impact of nosemosis on the intestinal yeast flora of honey bee. Medycyna Weterynaryjna (Veterinary Medicine – Science and Practice), 69, 726-730.	0,220	0,162	15	15
P5	Ptaszyńska A.A.* , Paleolog J., Borsuk G. 2016. <i>Nosema ceranae</i> infection promotes proliferation of yeasts in honey bee intestines. PLoS ONE, 11, e0164477. doi:10.1371/journal.pone.0164477	3,540	3,702	35	35
P6	Ptaszyńska A.A.* , Borsuk G., Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M., Małek W. 2016. E-pub 2015. Are commercial probiotics and prebiotics effective in the treatment and prevention of honeybee nosemosis C? Parasitology Research, 115, 397-406, doi: 10.1007/s00436-015-4761-z	2,410	2,251	30	30
	Suma punktów	11,039	10,446	155	150

* autor korespondencyjny

autorzy mieli równy wkład w przygotowanie publikacji

^a IF zgodny z rokiem ukazania się pracy

^b punkty MNiSW wg wykazu obowiązującego w roku opublikowania

IV. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

1. Wprowadzenie

Mikrosporidia to obligatoryjne, wewnątrzkomórkowe pasożyty zwierząt, w tym również człowieka. Ostatnio zostały zakwalifikowane jako nowy typ (phylum) w obrębie królestwa grzyby (Keeling i Fast 2002). Pierwszy gatunek mikrosporydiów, tj. *Nosema bombycis* został opisany w 1857 r. jako przyczyna pebryny, choroby pieprzowej jedwabników morwowych. Pebryna w połowie XVII w. była przyczyną dużych strat w hodowli tych owadów we Francji i Włoszech, jednak ówcześni naukowcy nie byli w stanie określić jej przyczyn. Dopiero rozwój mikroskopii pozwolił zaobserwować zarodniki *N. bombycis* i sklasyfikować organizm je wytwarzający do nowej jednostki taksonomicznej. Nägeli uznał *Nosema* za grzyb drożdżopodobny i przyporządkował odkryty przez siebie gatunek do Schizomycetes, jednostki systematycznej, do której włączone były organizmy obecnie zaliczane do grzybów i bakterii (Wittner i Weiss 1999).

U człowieka pierwszy przypadek choroby wywołanej przez mikrosporidia został opisany w 1959 r., ale do czasu epidemii AIDS, czyli do połowy lat 70-tych ubiegłego wieku, mikrosporidiozy ludzi były bardzo rzadkie. W chwili obecnej organizmy te są rozpoznawane jako patogeny ludzi z zaburzeniami odporności, u których powodują ciężkie jelitowe, oczne i mięśniowe zakażenia. Najczęściej ludzkie mikrosporidiozy wywoływane są przez *Enterocytozoon bienersi*, który po raz pierwszy został opisany w 1985 jako pasożyt powodujący potencjalnie śmiertelną biegunkę wśród osób chorych na AIDS (Didier 2005).

Początkowo mikrosporydia uważano za pierwotne organizmy eukariotyczne (Protozoa) ze względu na brak mitochondriów, klasycznie zbudowanych aparatów Golgiego oraz rybosomy 70S o prokariotycznej budowie. Dopiero zastosowanie filogenetyki molekularnej opartej na analizie sekwencji genów, które kodują m.in. β -tubulinę, podjednostkę polimerazy RNA II, białko wiążące TATA oraz czynniki translacyjne EF-1 i EF-2 umożliwiło sklasyfikowanie mikrosporydiów wśród grzybów (Keeling i in. 2000; Keeling i Fast 2002; Lee i in. 2008).

Nosemoza, groźna choroba pszczół miodnych, powodowana jest przez dwa gatunki mikrosporydiów, tj. *Nosema apis* i *N. ceranae*. Mikrosporydioza wywołwana przez *N. apis* określana jest jako nosemoza typu A, natomiast przez *N. ceranae* jako

nosemoza C lub „sucha” (Higes i in. 2010). Wymieranie pszczół na całym świecie jest problemem zarówno z ekonomicznego, jak i ekologicznego punktu widzenia. Około 100 gatunków roślin zapewnia 90% pożywienia na świecie, a 71 z tych 100 gatunków jest zapylanych przez owady pszczołowe. Obecność pszczół na terenach niezurbanizowanych zwiększa różnorodność biologiczną występujących roślin owadopylnych. Wiadomo, że utrata choćby jednego elementu środowiska naturalnego może okazać się kluczowa dla funkcjonowania całego ekosystemu.

Pierwszy opis nosemozy pochodzi z 1909 r. (Zander 1909). Wtedy choroba pszczół miodnych powodowana była wyłącznie przez jeden gatunek mikrosporydiów, tj. *Nosema apis*. W 1996 r. rozpoznano nowy gatunek *N. ceranae* (Fries i in. 1996) porażający pszczoły wschodnie *Apis cerana*, które występują endemicznie w gorącym i wilgotnym klimacie Azji. Pierwsze naturalne zakażenie pszczół miodnych (*Apis mellifera*) powodowane przez *N. ceranae*, a tym samym zmianę oryginalnego gospodarza tych pasożytniczych mikrosporydiów, odnotowano wśród pszczół utrzymywanych na Tajwanie (Huang i in. 2005). Później infekcje wykryto na terenie Europy (Higes i in. 2006), w tym również w Polsce (Topolska i Kasprzak 2007). Tym samym pasożyt zmienił nie tylko gospodarza, ale rozpoczął spektakularną ekspansję na nowym kontynencie w zupełnie innych warunkach klimatycznych. W 2008 r., już w 55% pasiek na terenie Polski obserwowano silne porażenie spowodowane przez *N. apis* i *N. ceranae* (Topolska i in. 2008).

Obecne obserwujemy wypieranie *N. apis* przez *N. ceranae* na całym świecie. *N. ceranae* określany jest jako pasożyt „elastyczny”, wykazujący dużą zdolność adaptacyjną zarówno do warunków fizjologicznych jakie panują w ciele różnych gatunków żywicielskich, jak też do warunków środowiskowych. Oprócz pszczoły wschodniej (*Apis cerana*) i pszczoły miodnej (*A. mellifera*) poraża on również inne gatunki pszczół, tj. pszczołę olbrzymia (*A. dorasta*), karłowatą (*A. florea*), kożewnikowa (*A. koschevnikovi*) oraz kilka gatunków trzmieli, u których nie zaobserwowano zakażeń wywołanych przez *N. apis* (Botías i in. 2009; Plischuk i in. 2009; Chaimanee i in. 2010). Fakt, że *N. ceranae* wykazuje wyższą kompetencję po wprowadzeniu do nowego środowiska, może sugerować, że gatunek ten wykształcił lepsze mechanizmy ucieczki przed układem odpornościowym gospodarza oraz że rozwija się i rozmnaża szybciej niż *N. apis*. Dlatego w chwili obecnej na całym świecie prowadzone są intensywne badania dotyczące *N. ceranae* oraz interakcji jakie

zachodzą w układzie: *N. apis*, *N. ceranae* i pszczoła miodna. Szersze omówienie tego zagadnienia można znaleźć w pracy przeglądowej **P1**, Ptaszyńska i in. 2013).

Zarówno *N. apis*, jak i *N. ceranae*, porażają komórki nabłonka jelita środkowego. Do niedawna uważano, że zarodniki *N. apis* można odnaleźć wyłącznie w jelicie pszczół, natomiast *N. ceranae* również w innych tkankach i gruczołach (m.in. Fries 2010). Ostatnie badania wykazały, że zarodniki *N. apis* i *N. ceranae* można odnaleźć również w cewkach Malpighiego, gruczołach gardzielowych, śliniankach i ciele tłuszczowym. Obecność zarodników w gruczołach gardzielowych wpływa na funkcje tych gruczołów, co prowadzi do obniżenia produkcji mleczka pszczelego. Moje dotychczasowe badania wskazują, że u zakażonych pszczół liczba zarodników *Nosema* spp. w gruczołach gardzielowych jest na tyle duża, że może być przyczyną upośledzenia lub nawet utraty ich funkcji wydzielniczych (Ptaszyńska i in. 2012). Ponadto, zarodniki pozostające w gruczołach gardzielowych stanowią potencjalne rezerwuary zakażenia kolejnych pszczół. Taki sposób przenoszenia chorób pszczelich został potwierdzony przez liczne badania dotyczące innych infekcji (m.in. Bailey 1955; 1968; Shen i in. 2005; Chen i in. 2006), więc najprawdopodobniej zachodzi również w przypadku nosemozy.

Inwazja *N. ceranae*, nowego dla Europy pasożyta stwarza atrakcyjne pole dla badań. Od niedawna został zidentyfikowany jako sprawca zakażeń *A. mellifera*, a jego biologia nie jest jeszcze dostatecznie poznana. Istotność takich badań zwiększa fakt, że *N. ceranae* uznawany jest za jedną z przyczyn depopulacji rodzin pszczelich w Europie.

Dlatego obszar moich zainteresowań, których część składa się na osiągnięcie habilitacyjne, koncentrował się wokół nowych metod rozróżniania zarodników *N. apis* i *N. ceranae*, które z jednej strony umożliwiają szybką i czułą detekcję tych grzybów a z drugiej pozwalają rozpoznać zarodniki obydwu gatunków na powierzchni tkanek i gruczołów. Możliwość obrazowania zarodników na powierzchni organów ciała pszczoły jest szczególnie ważna ze względu na interakcje jakie występują między nowym, ekspansywnym patogenem jakim jest *N. ceranae* a fizjologiczną mikrobiotą pszczoły miodnej. Interakcje takie do tej pory nie były opisane. W momencie rozpoczęcia moich badań znana była budowa zarodników, cykl rozwojowy *N. apis* oraz sposób detekcji patogenów oparty na klasycznej reakcji PCR. W przypadku *N. ceranae* cykl rozwojowy został opisany dopiero w 2010 r. (Gisder i in. 2010b). Nie znano szybkich metod rozróżniania obydwu gatunków, takie jak np. LAMP, brak było również danych opisujących morfologię porównawczą zarodników oraz wpływu

rozwoju *N. ceranae* na mikroorganizmy jelitowe pszczoły miodnej. A przecież fakt, że *N. ceranae* rozwija się w jelicie środkowym wpływa zarówno na mikroorganizmy jelitowe pszczoły, jak i na stan przewodu pokarmowego.

Trzon mojego osiągnięcia stanowi jedna praca przeglądowa oraz pięć prac eksperymentalnych. W pracy przeglądowej opisano budowę zarodników *N. apis* i *N. ceranae*, oraz przebieg i wpływ zakażenia nosemozą zarówno na organizm pojedynczej pszczoły miodnej, jak i całej rodziny pszczelej. Dwie prace metodyczne umożliwiają detekcję *N. ceranae* w nowym środowisku, a kolejne trzy prace badawcze opisują wpływ *N. ceranae* na mikroorganizmy jelitowe pszczoły miodnej.

2. Opis osiągnięcia naukowego

W ostatnich latach wykonano wiele szczegółowych badań dostarczających nowej wiedzy na temat nosemozy, pomimo tego nie do końca poznano biologię i patologię *Nosema* spp., a w szczególności niedawno odkrytego u *A. mellifera* *N. ceranae*. W artykule przeglądowym (P1) podsumowałam dotychczasową wiedzę zarówno o samej chorobie, jak też o gatunkach grzybów ją wywołujących. Twórczym i nowatorskim elementem tej pracy jest zaproponowanie zmiany nomenklatury używanej podczas opisywania struktur i zjawisk związanych z budową *Nosema* spp. oraz przebiegiem procesu patogenezy. Na przykład omawiając budowę ściany komórkowej zarodników zwrócono uwagę na pewne nieścisłości dotyczące ich ogólnej budowy. Po pierwsze, ściana komórkowa zarodników składa się z dwóch warstw dotychczas nazywanych egzosporą i endosporą. Nie są to nazwy błędne i często występują w literaturze, ale w chwili obecnej powinny być zmieniane na endosporium i egzosporium (Kirk i in. 2008). Obydwa terminy, tj. egzospora i endospora odnoszą się do sposobu powstawania oraz lokalizacji zarodników, a nie do budowy ich ściany komórkowej. Budowa jądra komórkowego to kolejna, nie do końca dobrze opisywana cecha mikrosporydiów. Niektórzy badacze błędnie używają określenia „dikariotyczny” w przypadku omawiania tej grupy organizmów. Jądra dikariotyczne są charakterystyczne dla grzybów właściwych (wyższych), czyli dla podstawczaków (Basidiomycota) oraz workowców (Ascomycota). Gisder i in. (2010b) opisując rozwój *Nosema apis* i *Nosema ceranae* używają sformułowania „diplokaryotic stage”, a powstające wtedy jądra określają mianem „diplokarya”. Oba pojęcia określają więc to

stadium jako dwujądrowe, ale nie dikariotyczne. Często używanym określeniem jest również słowo „binucleate”, czyli dosłownie „dwujądrowy” (Wittner i Weiss 1999). Pracę przeglądową opublikowano w czasopiśmie weterynaryjnym ze względu na chęć rozpropagowania wiedzy na temat mikrosporydiów i zagrożeń z nimi związanych w otoczeniu społeczno-gospodarczym.

Oprócz nieścisłości związanych z dobieraniem odpowiednich terminów do opisu mikrosporydiów, organizmy te sprawiają również trudności w diagnostyce, ze względu na małe rozmiary zarodników. Z tego powodu jednym z pierwszych problemów badawczych, które podjęłam w ramach osiągnięcia naukowego były nowe rozwiązania umożliwiające jednoznaczną detekcję *N. apis* i *N. ceranae*, zarówno za pomocą technik opartych na amplifikacji specyficznych odcinków DNA, jak i nowoczesnych technik mikroskopowych.

Rozróżnienie zarodników mikrosporydiów, podobnie jak i innych grzybów, może być oparte na analizie DNA specyficznego dla patogena. Metody te szeroko zostały opisane w pracy Fries i in. z 2013 r. Szybko rozwijające się techniki biologii molekularnej stawiają cały czas wyzwania dla naukowców chcących zastosować je w swoich badaniach. Jedną z takich nowych technik jest *loop mediated isothermal amplification* (LAMP). Metoda ta polega na izotermicznej amplifikacji specyficznego odcinka DNA i pozwala na szybką identyfikację patogenów ludzkich, zwierzęcych oraz roślinnych. W przeciwieństwie do reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), techniki, w której reakcję prowadzi się przez serię kolejnych zmian temperatury, amplifikację w reakcji izotermicznej (LAMP) prowadzi się w stałej temperaturze 60-70°C i nie wymaga ona jej cyklicznych zmian. Dodatkowo reakcja LAMP przebiega przy zastosowaniu dwu lub trzech zestawów starterów i polimerazy, która oprócz podstawowej funkcji syntezy nici DNA w kierunku 5'→3' ma również aktywność wymiany nici DNA (ang. *strand displacement activity*), dzięki temu nie jest potrzebna dodatkowa denaturacja matrycy i reakcję można prowadzić w warunkach izotermicznych (Notomi i in. 2000). Standardowo, stosowane są cztery różne startery, do których można dołączyć dodatkową parę tzw. starterów "pętli" (*loop*), co znacząco przyspiesza reakcję (Nagamine i in. 2002). Ilość DNA wytworzonego w reakcji LAMP jest znacznie większa niż w reakcji amplifikacji opartej na klasycznym PCR. Dlatego, co jest bardzo istotne, dodatni wynik reakcji LAMP można zaobserwować „gołym” okiem w postaci białego osadu na dnie próbówki, po wprowadzeniu magnezu do

mieszaniny reakcyjnej (Mori i in. 2001). Eliminuje to konieczność analizy produktów amplifikacji w żelu.

Technika LAMP została po raz pierwszy metodycznie zaprojektowana do rozróżniania *N. apis* i *N. ceranae* podczas moich badań opisanych w **P2**. Jest to rozwiązanie nowatorskie opracowane na potrzeby prowadzonych badań. Zaprojektowane zostały wtedy startery do reakcji LAMP, dodatkowe startery „pętli”, przyspieszające reakcje oraz zoptymalizowano warunki przeprowadzenia reakcji LAMP specyficznej dla *N. apis* i *N. ceranae*. Technika ta umożliwia szybkie i bardzo czułe rozróżnienie tych dwu gatunków mikrosporydiów, bez konieczności zastosowania specjalistycznego sprzętu analitycznego. Do przeprowadzenia opisanej w **P2** reakcji LAMP wystarczy zwykła łaźnia wodna utrzymująca temperaturę reakcji na stałym poziomie. Poza tym czas reakcji LAMP jest bardzo krótki, wyniki otrzymuje się już po 30 min, przy czym, dzięki zastosowaniu zaprojektowanych w moich badaniach trzech par starterów, jest to reakcja wysoce specyficzna i ok. 10^3 czulsza od standardowego PCR. Opracowana podczas moich badań metoda LAMP jest dobrą alternatywą dla standardowej techniki PCR. Identyfikacja DNA *N. apis* i *N. ceranae* odbywa się z wysoką czułością i specyficznością gatunkową. Niskie koszty aparatury potrzebnej do izotermicznej amplifikacji DNA (łaźnia wodna lub blok grzejny) umożliwiają szybką detekcję nosemozy nawet przez małe laboratoria, wyposażone jedynie w stopniu podstawowym w aparaturę badawczą. Dlatego praca **P2** jest istotnym osiągnięciem aplikacyjnym, stanowi duży, nowatorski wkład w udoskonalenie warsztatu badawczego i daje możliwość do oceny skutków inwazji *N. ceranae* w Europie. Szybkie rozpoznanie problemu jest pierwszym krokiem do jego rozwiązania.

W chwili obecnej najbardziej popularna metoda detekcji zarodników *Nosema* spp. oparta jest na analizie preparatów wykonanych z zakażonych pszczoł w mikroskopie świetlnym. Technika ta nie pozwala jednak rozróżnić gatunków patogena (Fries i in. 2013). Techniki oparte o elektronową mikroskopię transmisyjną (Fries i in. 2006) umożliwiły określenie wewnętrznej budowy zarodników i rozróżnienie gatunków, ale nie pozwalały na obserwację zarodników na powierzchni tkanek. W celu rozwiązania powyższych problemów i uzupełnienia informacji o ich morfologii, zarodniki należące do *N. apis* i *N. ceranae* poddano analizie w skaningowej mikroskopii elektronowej (**P3**). Przeprowadzone badania umożliwiły jednoznaczne rozróżnienie zarodników obydwu gatunków na podstawie różnic w urzęźbieniu ich egzosporium. Wykazano również, że jelito pszczoł naturalnie porażonych nosemozą w stopniu średnim (tj. 59×10^6

zarodników/pszczołę), jest pokryte jednorodną warstwą zarodników, która może upośledzać zdolność jelita do wchłaniania substancji odżywczych i prowadzi nawet do depopulacji całej rodziny pszczelej (Fig. 1). Praca **P3** pogłębia wiedzę na temat detekcji *N. apis* i *N. ceranae* oraz patogenezy nosemozy. Ma dużą wartość praktyczną, zyskała bowiem zainteresowanie zarówno naukowców, jak i osób związanych z pszczelarstwem o czym świadczy fakt, że na prośbę niezależnego wydawcy została przetłumaczona z języka angielskiego (oryginalna wersja) na język hiszpański przez czasopismo „Revista de Apicultura” [Ptaszyńska A.A., Borsuk G., Mułenko W., Demetraki-Paleolog J. 2015. Diferenciação de esporos entre *Nosema apis* e *Nosema ceranae* através de uma análise microscópica electrónica (SEM – Scanning Electron Microscopy). 24 (89 Jul. /Set. 15), 3-10. Tłumaczenie artykułu (reprint) z 2014. Differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* spores under Scanning Electron Microscopy (SEM). Journal of Apicultural Research, 53, 537-544 doi: 10.3896/IBRA.1.53.5.02.].

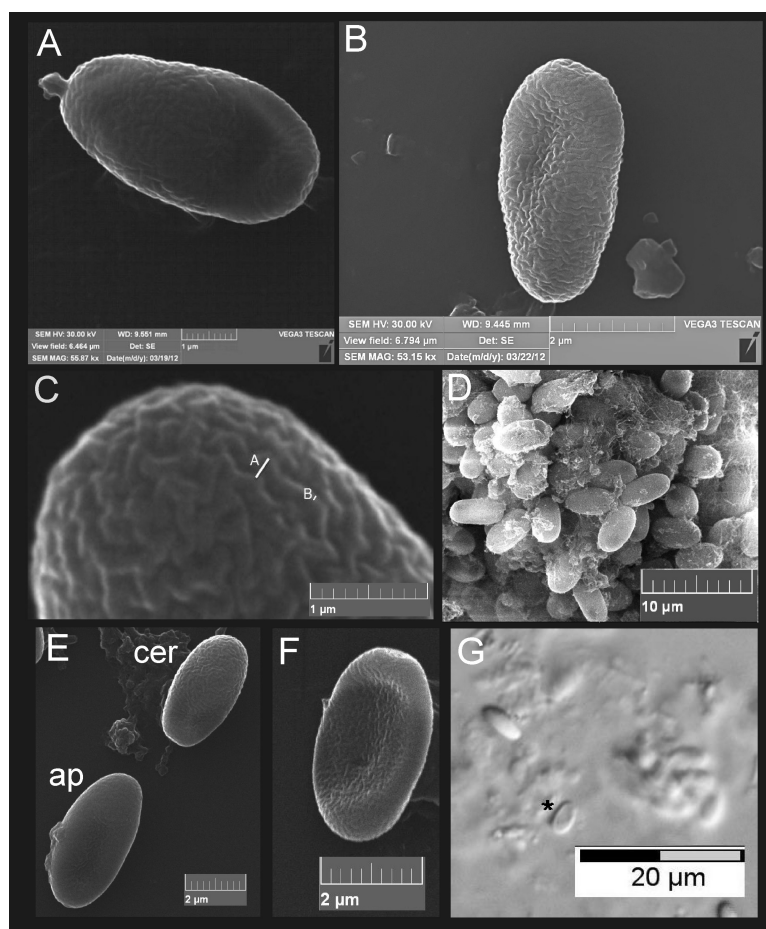


Fig. 1. (A-F) mikrofotografie zarodników *Nosema apis* i *Nosema ceranae* wykonane w skaningowej mikroskopii elektronowej. (A) zarodnik *N. apis*, początek

wystrzeliwania nici biegunowej, (B) zarodnik *N. ceranae*, (C) zarodnik *N. ceranae*, pokazane odległości między bruzdami w egzosporium (a) oraz szerokości bruzd (b), (D) obraz jelita pszczoły miodnej porażonej nosemozą w stopniu średnim, (E) zarodniki dwóch gatunków: ap - *N. apis*, cer - *N. ceranae*, (F) obraz zarodnika *N. ceranae* po wystrzeleniu nici biegunowej, (G) mikrofotografia zarodników *Nosema* spp. obserwowanych w mikroskopie świetlnym przy użyciu kontrastu interferencyjnego (DIC), gwiazdka (*) oznacza obraz zarodnika po wystrzeleniu nici biegunowej; (P3, Ptaszyńska i in. 2014).

Na ogólną odporność organizmu, a także na możliwość przyswajania niektórych substancji odżywczych znaczący wpływ ma mikroflora jelitowa. Prowadzone przeze mnie obserwacje jelit pszczoł zakażonych nosemozą, które opisano w P3, skierowało moje zainteresowania na inne organizmy występujące w przewodzie pokarmowym pszczoł, jakimi są drożdżaki. Zarówno mikrosporydia, jak i workowce, do których należą drożdżaki są grzybami, a zamieszkując wspólną niszę ekologiczną powinny konkurować o substancje odżywcze. Dotychczas znane były nieliczne prace opisujące grzyby mikroskopijne zasiedlające jelita pszczoł (Gilliam i Prest 1972; Gilliam 1973; Gilliam i in. 1974, Gilliam i Taber 1991), natomiast wpływ zakażenia nosemozą na rozwój innych grzybów występujących w przewodzie pokarmowym pszczoł dotychczas nie był znany i opisany.

W celu wstępnego określenia wpływu nosemozy na drożdżaki zasiedlające przewód pokarmowy pszczoły miodnej przeprowadzono doświadczenia klatkowe, w których badano korelację pomiędzy intensywnością zakażenia pszczoł nosemozą a liczbą drożdżaków należących do dwóch rodzajów: *Candida* i *Saccharomyces* mierzoną w jednostkach tworzących kolonię na pszczole (jtk/pszczole). Jako próbę kontrolną wykorzystano pszczoły zdrowe (P4). U zdrowych pszczoł miodnych drożdżaki zasiedlały jelito w liczbie od 1 056 do 5 180 jtk/pszczole (jednostek tworzących kolonię). Stopień porażenia nosemozą miał wpływ na skład ilościowy mikroflory jelitowej pszczoł. Pszczoły zakażone nosemozą w stopniu lekkim miały od 15 770 do 44 915 jtk drożdżaków. U mocno porażonych pszczoł znacznie zmniejszyła się liczba komórek drożdżaków, która wynosiła od 120 do 960 jtk. Zmniejszenie liczby jtk drożdżaków zasiedlających jelito pszczoł obserwowane podczas ciężkich zakażeń prawdopodobnie związane było z konkurencją pomiędzy mikrosporydiami a pozostałymi grzybami o źródła pokarmu i zasiedlaną mikroniszę.

W celu określenia wpływu nosemozy na grzyby mikroskopijne zasiedlające przewód pokarmowy pszczoł w trakcie sezonu pasiecznego (od marca do października) przeprowadzono kolejne doświadczenie monitorujące mikroorganizmy jelitowe w ciągu dwóch sezonów (**P5**). Tym razem, wykonano testy w ulach i w klatkach zwracając szczególną uwagę na inwazyjnego patogena jakim jest *N. ceranae*. Sprawdzono czy występuje zgodność pomiędzy badaniami polowymi a klatkowymi (**P5**). Zakażenia pszczoł spowodowane przez *N. ceranae* wykazywały specyficzne fluktuacje w trakcie sezonu pasiecznego i wahały się od $7,6 \times 10^8$ zarodników/pszczołę w marcu do $5,8 \times 10^6$ w październiku. Ponadto odnotowano dodatkowy letni wzrost zakażenia, który nie został zarejestrowany przez innych autorów (Gisder i in. 2010a; Mulholland i in. 2012; Traver i in. 2012). Podobną sezonową zmienność zaobserwowano w przypadku wielkości populacji drożdżaków zasiedlających jelita pszczoł. Jelita pszczoł zakażonych *N. ceranae* zasiedlało 5 razy więcej drożdżaków (średnie wyniki w miesiącu maju, jtk=16 280; współczynnik zmienności $V=14,16\%$) w porównaniu do pszczoł niezakażonych (średnie wyniki w miesiącu maju, jtk=3 240; $V=10,06\%$). Jest to dowód na to, że zakażenia pszczoł wywoływane przez *N. ceranae* aktywują dodatkowe oportunistyczne infekcje drożdżakami, co może prowadzić do szybszej depopulacji rodzin pszczelich. Porównując wyniki przedstawione w pracach **P4** i **P5** można zaryzykować twierdzenie, że przy niskim stopniu zakażenia *N. ceranae* nie ma konkurencji istnieje natomiast synergizm pomiędzy tym pasożytem a drożdżakami. Dopiero przy wysokim stopniu infekcji *N. ceranae* możemy mówić o konkurencji i hamowaniu rozwoju drożdżaków przez *N. ceranae*.

Wschodnioeuropejska granica zasięgu *N. ceranae* przebiega przez Ukrainę (Yefimenko i in. 2014), ale nie istnieją żadne dane dotyczące sezonowości zakażeń omawianym patogenem z tego obszaru. Dlatego zaprezentowane w **P5** wyniki są pierwszym doniesieniem pokazującym występowanie i charakter sezonowych fluktuacji z dodatkowym, dotąd nie obserwowanym szczytem w okresie letnim w intensywności zakażenia *N. ceranae* na wschodnioeuropejskiej granicy zasięgu tego gatunku.

W eksperymentach klatkowych opisanych w **P5**, najniższą liczbę zarodników w preparatach mikroskopowych obserwowano drugiego i trzeciego dnia po podaniu pszczołom materiału zakaźnego, zawierającego zarodniki *N. ceranae*, co było związane z początkowym etapem rozwoju choroby. W miarę trwania eksperymentu obserwowano stały wzrost poziomu zakażenia pszczoł *N. ceranae*. Średnia liczba drożdżaków, mierzona jako liczba jtk/pszczołę, na koniec doświadczenia wynosiła 2 025 ($V = 13,04$)

dla pszczoł niezakażonych i 11 150 ($V = 14,06$) dla zakażonych. W testach klatkowych nie wykazano żadnych fluktuacji w przebiegu nosemozy oraz liczby jtk drożdżaków. Świadczy to o tym, że na zmiany obserwowane w testach polowych miały wpływ czynniki zewnętrzne, najprawdopodobniej związane ze zmianami temperatury podczas sezonu pasiecznego.

Analiza wyników eksperymentów opisanych w pracach **P4 - P5**, pozwoliła mi sformułować wstępną hipotezę o znaczeniu wzbogacenia bakteryjnej flory jelitowej pszczoł i jej wpływie na ograniczenie lub zahamowanie rozwoju nosemozy (**P6**). Pozytywna weryfikacja, powyżej przytoczonej hipotezy, otworzyłaby nowe możliwości przed biologicznymi metodami zwalczania nosemozy. W celu eksperymentalnego sprawdzenia wpływu jakości flory jelitowej pszczoł na podatność na zakażenie nosemozą podawano pszczołom liofilizat zawierający komercyjnie dostępne bakterie probiotyczne. Z powodu braku preparatów probiotycznych przeznaczonych dla pszczoł, podawano pszczołom liofilizat zawierający *Lactobacillus rhamnosus*. Bakterie probiotyczne *L. rhamnosus* zostały wybrane ze względu na wysoki wskaźnik przeżycia w syropie cukrowym, który jest standardowo używany do karmienia pszczoł podczas doświadczeń klatkowych. Równocześnie podawano komercyjny prebiotyki – inulinę. Stworzono cztery grupy eksperymentalne: karmioną czystym syropem cukrowym, syropem cukrowym z dodatkiem probiotyku, syropem cukrowym z dodatkiem prebiotyku oraz jednocześnie probiotyku i prebiotyku.

Pszczoły karmione syropem cukrowym z dodatkiem probiotyku oraz jednocześnie probiotyku i prebiotyku były bardziej podatne na zakażenia *N. ceranae* i jednocześnie znacząco skracała się długość ich życia. Poziom zakażenia pszczoł karmionych syropem cukrowym z dodatkiem probiotyku 9 dni przed zakażeniem był 25 razy większy (970 mln zarodników/pszczołę) niż w grupie kontrolnej karmionej przed zakażeniem czystym syropem cukrowym (38 mln zarodników/pszczołę). Jedynie inulina (prebiotyki) podawana w stężeniu 2 $\mu\text{g/ml}$ syropu cukrowego nie wpływała znacząco na rozwój nosemozy i na przeżywalność pszczoł. Wstępna hipoteza nie znalazła potwierdzenia. Wynika z tego, że suplementacja diety pszczoł nieprawidłowo dobranymi probiotykami lub pro- i prebiotykami, nie zawierającymi specyficznych gatunkowo bakterii jelitowych, nie tylko nie zapobiegała rozwojowi nosemozy, ale *L. rhamnosus* potęgował rozwój infekcji powodowanej przez *N. ceranae*. Podawanie tego typu preparatów, może doprowadzać do zmian w układzie odpornościowym pszczoł i znacząco zwiększać śmiertelność tych owadów.

Wyniki badań stały się impulsem do podjęcia próby opracowania probiotyku przeznaczonego dla pszczoł i zostały szerzej opisane w V.6. „Inne realizowane obecnie zadania badawcze” oraz V.7. „Dalsze plany badawcze”.

3. Podsumowanie najważniejszych osiągnięć:

1. Zebrano, usystematyzowano i opracowano informacje dotyczące budowy zarodników *N. apis* i *N. ceranae*, rozwoju nosemozy i jej wpływu zarówno na organizm pojedynczej pszczoły, jak i całej rodziny pszczoł.
2. Opracowano nową, szybką i czułą metodę wykrywania oraz rozróżniania *N. apis* i *N. ceranae* przy użyciu techniki LAMP.
3. Po raz pierwszy przedstawiono różnice morfologiczne w budowie zarodników *N. apis* i *N. ceranae* umożliwiające ich jednoznaczne odróżnienie.
4. Opisano wpływ nosemozy na mikroorganizmy jelitowe pszczoły miodnej. Wykazano w jakich warunkach zachodzi konkurencja, a w jakich synergizm pomiędzy *N. ceranae* a drożdżakami występującymi w jelicie pszczoły.
5. Opisano sezonowe fluktuacje w stopniu zakażenia pszczoł *N. ceranae* na wschodnioeuropejskiej granicy zasięgu występowania gatunku.
6. Opisano negatywny wpływ suplementacji diety pszczoł komercyjnymi pro- i prebiotykami, który prowadził do szybszego rozwoju nosemozy.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w pięciu oryginalnych pracach naukowych, których byłam autorem korespondencyjnym. Projektowałam i przeprowadzałam wszystkie opisane eksperymenty. Wniosłam też znaczący wkład w koncepcję badań, analizę i opracowanie graficzne wyników oraz przygotowanie manuskryptów prac. Do osiągnięcia włączyłam również artykuł przeglądowy, w którego przygotowaniu miałam dominujący udział i byłam jego autorem korespondencyjnym.

Bibliografia:

- Bailey L. 1955. The epidemiology and control of *Nosema* disease of the honeybee. *Ann Appl Biol.* 43, 379-389.
- Bailey L. 1968. Honey bee pathology. *Annu Rev Entomol.* 13, 191-212.

- Botías C., Martín-Hernández R., Garrido-Bailón E., Higes M., Anderson D.L. 2009. *Nosema ceranae* is able to infect different *Apis* species, Proc. 41st Congress Apimondia, Montpellier, s. 161.
- Chaimanee V., Waritt N., Chantawannakul P. 2010. Infection of *Nosema ceranae* in four different honeybee species. J Invert Pathol. 105, 207-210.
- Chen Y., Evans J., Feldlaufer M. 2006. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. J Invert Pathol. 92, 152-159.
- Didier E.S. 2005. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. Acta Trop. 94, 61–76.
- Franzen C., Müller A. 2001. Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. Microbes Infect. 3, 389–400.
- Fries I. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). J Invert Pathol. 103, S73–S79.
- Fries I, Chauzat M.-P, Chen Y-P, Doublet V, Genersch E, Gisder S, i in. 2013. Standard methods for nosema research. [In:] V. Dietemann, J. D. Ellis, P. Neumann (Eds) The Coloss Beebook: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. J Apicult Res. doi: 10.3896/IBRA.1.52.1.14
- Fries I., Feng F., Silva A.D., Slemenda S.B., Pieniazek N.J. 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). Eur J Protistol. 32, 356–365. [http://dx.doi.org/10.1016/S0932-4739\(96\)80059-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0932-4739(96)80059-9).
- Fries I., Martín R., Meana A., García-Palencia P., Higes M. 2006. Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. J Apicultural Res. 45, 230–233.
- Gilliam M. 1973. Are yeasts present in adult worker honey bees as a consequence of stress? Ann Entomol Soc. Am. 66, 1176.
- Gilliam M., Prest D.B. 1972. Fungi isolated from the intestinal contents of foraging worker honey bees, *Apis mellifera*. J Invert Pathol. 20, 101–103.
- Gilliam M., Taber S. 1991. Diseases, pests, and normal microflora of honeybees *Apis mellifera*, from feral colonies. J Invert Pathol. 58, 286–289.
- Gilliam M., Wickerham L.J., Morton H.L., Martin R.D. 1974. Yeasts isolated from honey bees, *Apis mellifera*, fed 2,4-D and antibiotics. J Invert Pathol. 24, 349–356.
- Gisder S., Hedtke K., Mockel N., Frielitz M.C., Linde A., Genersch E. 2010a. Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: Does climate shape virulence and

- assertiveness of *Nosema ceranae*? Appl Environ Microbiol. 76, 3032–3038. doi: 10.1128/AEM.03097-09 PMID: 20228103.
- Gisder S., Möckel N., Linde A., Genersch E. 2010b. A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. Environ Microbiol. 13, 404–413.
- Higes M., Martín R., Meana A. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honey bees in Europe. J Invertebr Pathol. 92, 93-95.
- Higes M., Martín-Hernández R., Meana A. 2010. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. Apidologie. 41, 375-392
- Huang W.F., Jiang J.H., Wang C.H. 2005. *Nosema ceranae* infection in *Apis mellifera*. 38th Annual Meeting of Society for Invertebrate Pathology, Anchorage, Alaska.
- Keeling P.J., Fast N.M. 2002. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. Annu Rev Microbiol. 56, 93–116.
- Keeling, P.J., Luker, M.A., Palmer, J.D. 2000. Evidence from beta tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. Mol Biol Evol. 17, 23–31.
- Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J. A. (red.) 2008. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 10th Edition. CAB International, Wallingford, UK.
- Lee S.C., Corradi N., Byrnes E.J. 3rd, Torres-Martinez S., Dietrich F.S., Keeling P.J., Heitman J. 2008. Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. Curr Biol. 18, 1675–1679.
- Mori Y., Nagamine K., Tomita N., Notomi T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem Biophys Res Commun. 289, 150–4. doi:10.1006/bbrc.2001.5921
- Mulholland G.E., Traver B.E., Johnson N.G., Fell R.D. 2012. Individual variability of *Nosema ceranae* infections in *Apis mellifera* colonies. Insects. 3, 1143–1155. doi: 10.3390/insects3041143
- Nagamine K., Hase T., Notomi T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol Cell Probes. 16, 223–9. doi:10.1006/mcpr.2002.0415
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 28, E63. doi:10.1093/nar/28.12.e63

- Plischuk S., Martín-Hernández R., Lucía M., Prieto L., Botías C., Meana A., Abrahamovich A.H., Lange C., Higes M. 2009. South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol Rep.* 1, 131-135.
- Ptaszyńska A.A., Borsuk G., Anusiewicz M., Mułenko W. 2012. Location of *Nosema* spp. spores within body of honey bee. *Med. Weteryn. Weterynaryjna* 68, 618-621.
- Shen M., Cui L., Ostiguy N., Cox-Foster D. 2005. Intricate transmission routes and interactions between picornalike viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J Gen Virol.* 86, 2281–2289.
- Topolska G., Kasprzak S. 2007. First cases of *Nosema ceranae* infection in bees in Poland. *Medycyna weterynaryjna* 63, 1504-1506.
- Topolska G., Gajda A., Hartwing A. 2008. Polish honey bee colony – loss during the winter 2007/2008. *J. Apic. Sci.* 52, 95-104.
- Traver B.E., Williams M.R., Fell R.D. 2012. Comparison of within hive sampling and seasonal activity of *Nosema ceranae* in honey bee colonies. *J Invert Pathol.* 109, 187–193. doi: 10.1016/j.jip.2011.11.001
- Wittner M., Weiss L.M. (red.). 1999. The microsporidia and microsporidiosis. ASM Press; Washington DC; USA. pp. 553.
- Yefimenko T.M., Odnosum H.V., Tokarev Y.S., Ignatieva A.N. .2014. *Nosema ceranae* Fries et al. 1996 (Microspora, Nosematidae) – a honey bee parasite in Ukraine. *Екологія.* 2, 70–75.
- Zander E. 1909. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Münchener Bienenzeitung* 31, 196–204.

V. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze

1. Praca naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora

a. Studia i praca magisterska

W latach 1994-1999 odbyłam studia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UMCS. Z wynikiem bardzo dobrym ukończyłam kierunek biotechnologia, uzyskując tytuł magistra biotechnologii. Tytuł mojej pracy magisterskiej brzmiał: „Badanie udziału produktu genu *UMP1 (DIN8)* w odpowiedzi *Saccharomyces cerevisiae* na uszkodzenia DNA”. Część eksperymentalną pracy magisterskiej wykonałam w Pracowni Mutagenезy i Reperacji DNA, Instytutu Biochemii i Biofizyki, Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Pracę magisterską obroniłam w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej UMCS pod kierunkiem prof. dr hab. Magdaleny Fikus. Głównym celem pracy było określenie wpływu genu *UMP1 (DIN8)* pod kontrolą skróconego promotora na mutagenne i letalne działanie metanosulfonianu metylowego oraz promieniowania UV w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Gen *UMP1 (DIN8)* należy do grupy genów *DIN*, których ekspresja jest indukowana w odpowiedzi na uszkodzenia DNA i powinna być zwiększona pod wpływem działania czynników genotoksycznych. Wyniki badań przedstawionych w pracy magisterskiej wykazały, że skrócenie odcinka DNA poprzedzającego, od strony 5', sekwencję kodującą *UMP1 (DIN8)* nie zmienia poziomu ekspresji tego genu ani stopnia indukcji jego transkrypcji pod wpływem metanosulfonianu metylowego. Natomiast wprowadzenie do komórek drożdży dodatkowej kopii genu *UMP1 (DIN8)* na plazmidzie pWD11 zmniejszało zarówno efekt letalny, jak i mutageny metanosulfonianu metylowego oraz promieniowania UV na komórki drożdży.

b. Studia doktoranckie i doktorat

Po uzyskaniu tytułu magistra trzy lata pracowałam w branży niezwiązanej z moim wykształceniem. Na Wydział Biologii i Nauk o Ziemi UMCS powróciłam w roku 2002 rozpoczynając studia doktoranckie w Zakładzie Zoologii. W trakcie studiów doktoranckich zainteresował mnie problem określania powiązań filogenetycznych pomiędzy gatunkami. Jako obiekt badań wybrałam owady należące do rodziny Pędrusiowate (Apionidae). To gatunki kosmopolityczne, ich larwy często żerują na roślinach uprawnych, ważnych z gospodarczego punktu widzenia. Klasyczna

identyfikacja tej grupy owadów opiera się, przede wszystkim na cechach morfologicznych. W wielu przypadkach jest to niewystarczające ze względu na występowanie taksonów o podobnych fenotypach oraz gatunków bliźniaczych. Poszerzenie wiedzy na temat biologii i ekologii, w przypadku gatunków bardzo podobnych morfologicznie i blisko spokrewnionych, nie pomaga w jednoznacznej identyfikacji tej grupy owadów. Pozycja systematyczna i status wielu gatunków nadal były niejasne i budziły wiele kontrowersji (Wagner 1926; Smreczyński 1965; Dieckmann 1977; Alonso-Zarazaga 1990, Hundsdoerfer i in. 2009). Rozwiązaniem wyżej opisanych problemów może być zastosowanie analizy filogenetycznej opartej na sekwencji specyficznych genów. Podstawowym celem mojej pracy doktorskiej stała się analiza zastosowania genu COI w taksonomii i systematyce wybranych gatunków owadów z rodziny Apionidae. Badany gen jest zlokalizowany na mitochondrialnym DNA. W celu zbadania pokrewieństwa między ryjkowcami z rodziny Apionidae oznaczyłam sekwencje genu COI przedstawicieli 23 gatunków z 15 różnych rodzajów, tj.: *Apion*, *Betulapion*, *Catapion*, *Ceratapion*, *Cyanapion*, *Eutrichapion*, *Exapion*, *Hemitrichapion*, *Holotrichapion*, *Ischnopterapion*, *Protapion*, *Pseudoperapion*, *Pseudoprotapion*, *Pseudostenapion* i *Stenopterapion*. Następnie porównałam je z dostępnymi w GenBanku sekwencjami COI 19 gatunków z 8 rodzajów pędrusiów, tj. *Aspidapion*, *Ceratapion*, *Exapion*, *Ischnopterapion*, *Lepidapion*, *Omphalapion*, *Oxystoma* i *Protapion*. Relacje filogenetyczne otrzymane na podstawie statystycznej analizy sekwencji poszczególnych gatunków były zbliżone do systemu klasyfikacji Apionidae opracowanego przez Alonso-Zarazaga i Lyal'a (1999), z pewnymi wyjątkami, w obrębie plemienia Oxystomatini i rodzajach *Ceratapion* oraz *Exapion*. Wyniki uzyskane dla genu COI porównałam z innymi, pochodzącymi z badania genów: mitochondrialnego, kodującego 16S rRNA oraz jądrowego, kodującego 18S rRNA. W tym celu zaprojektowałam specyficzne startery dla badanych gatunków Apionidae oraz zoptymalizowałam warunki PCR. Opracowałam również oryginalną metodę izolacji DNA z przechowywanych od ponad 60-ciu lat okazów muzealnych i eksykatów. Wynikiem moich badań było oznaczenie dystansu genetycznego pomiędzy gatunkami i skonstruowanie drzewa filogenetycznego.

W dniu 10 stycznia 2007 r. obroniłam pracę doktorską zatytułowaną: „Zastosowanie metod biotechnologicznych w badaniach nad pędrusiami (*Apionidae: Curculionoidea*)” i uzyskałam tytuł doktora nauk biologicznych. Promotorem rozprawy doktorskiej był dr hab. Jacek Łętowski, prof. UMCS, a recenzentami: prof. dr hab.

Leszek Drozd z Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie oraz prof. dr hab. Wacław Wojciechowski z Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

Wyniki badań filogenetycznych Apionidae były współfinansowane ze środków Unii Europejskiej z Europejskiego Funduszu Społecznego i zostały przedstawione w formie doktoratu, posteru oraz publikacji naukowej.

- **Ptaszyńska A.A.** 2007. „Zastosowanie metod biotechnologicznych w badaniach nad pędrusiami (*Apionidae: Curculionoidea*)”. Praca doktorska UMCS, pp.124.
- **Ptaszyńska A.A.**, Łętowski J. 2006. Cechy morfologiczne i genetyczne plemienia *Oxystomatini* w oparciu o wybrane gatunki pędrusiów (*Apionidae: Curculionoidea*). Materiały z VII Sympozjum Polskiego Towarzystwa Taksonomicznego „Jednostka systematyczna – aspekty morfologiczne i genetyczne”, Ojców, 18-20 maj, p. 28.
- **Ptaszyńska A.A.**, Łętowski J, Gnat S, Małek W. 2012. Application of COI sequences in studies of phylogenetic relationships among 40 Apionidae species. Journal of Insect Science 12:16 available online: insectscience.org/12.16 (Impact Factor: 1,014; punkty MNiSW: 30).

Bibliografia:

- Alonso-Zarazaga MA. 1990. Revision of the supraspecific taxa in the Palaearctic Apionidae Schoenherr, 1823 (Coleoptera, Curculionoidea) 2 Subfamily Apioninae Schoenherr, 1823: Instruction, keys and descriptions. Graellsia 46, 19-156.
- Alonso-Zarazaga MA, Lyal CHC. 1999. A World Catalogue of Families and Genera of Curculionoidea (Insecta: Coleoptera) (Excepting Scolytidae and Platypodidae). Entomopraxis.
- Dieckmann L. 1977. Beiträge zur Insektenfauna der DDR: Coleoptera– Curculionidae (*Apioninae*). Beiträge zur Entomologie 27, 7-143.
- Hundsdoerfer A, Meier H, Rheinheimer J, Wink M. 2009. Towards the phylogeny of the Curculionoidea (Coleoptera): Reconstructions from mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences. Zoologischer Anzeiger 248, 9-31.
- Smreczyński S. 1965. Klucze do oznaczania owadów Polski. Cz. XIX, Zesz. 98a (Coleoptera, Curculionidae). PWN.

Wagner H. 1926. Apion-Studien II. (Curcl.). Revision des Subgen. *Protapion* Schilsky. (45. Beitrag zur Kenntnis der Subfam. Apioninae). Coleopterologisches Centralblatt 1, 123-151, 212-243, 333-355.

c. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze

W trakcie studiów doktoranckich oprócz badań związanych z tematyką mojej rozprawy doktorskiej współpracowałam z dr hab. M. Fiołką. Zajmowałam się izolacją bakterii jelitowych z poczwarek szrotówka kasztanowcowiaczka (*Cameraria ohridella*). W przewodzie pokarmowym poczwarek *C. ohridella* zostały zidentyfikowane bakterie *Aerococcus viridans* oraz *Aeromonas salmonicida*. Wytwarzają one substancje o aktywności przeciwdrobnoustrojowej typu lizozymu o masach 15 kDa i 28 kDa rozpoznawanych przez przeciwciała skierowane przeciw lizozymowi białka jaja kurzego. W ekstrakcie z poczwarek szrotówka, analizowanych techniką bioautografii zostały również oznaczone dwie formy lizozymu, a wyniki tych badań zostały opublikowane w pracy:

- Fiołka M., Ptaszyńska A.A., Czarniawski W. 2005. Antibacterial and antifungal lysozyme type activity in *Cameraria ohridella* pupae. Journal of Invertebrate Pathology 90, 1-9 (Impact Factor: 2,049; punkty MNISW: 32).

2. Praca naukowa po uzyskaniu stopnia doktora

a. Zróżnicowanie genetyczne starca wielkolistnego (*Senecio macrophyllus* M. Bieb.)

Po uzyskaniu stopnia doktora pracowałam, jako wykładowca w Zakładzie Ekologii UMCS. Tematem moich badań było zróżnicowanie genetyczne starca wielkolistnego (*Senecio macrophyllus*). Zasięg tego gatunku jest ograniczony do nielicznych stanowisk na terenie Polski i Ukrainy. W Polsce znana jest z trzech stanowisk położonych koło Tomaszowa Lubelskiego i Chełma. Starzec wielkolistny należy do gatunków zagrożonych, kategoria zagrożenia VU i jest umieszczony na „Czerwonej liście roślin i grzybów Polski” (2006) oraz w „Polskiej Czerwonej Księdze Roślin” (2001, 2014). Pulę genową *S. macrophyllus*, ze względu na duże zróżnicowanie genetyczne pomiędzy osobnikami wszystkich polskich populacji, można określić jako dość bogatą. Wyniki prowadzonych badań zaprezentowałam na Międzynarodowej Konferencji Naukowej,

„Environmental Changes and Biological Assessment” w Czechach. Rozszerzona wersja referatu ukazała się później w materiałach pokonferencyjnych opublikowanych w *Scripta Facultatis Rerum Naturalium Universitatis Ostraviensis*.

- Czarnecka B., **Ptaszyńska A.A.** 2008. Genetic diversity within the island population of *Senecio macrophyllus* M. BIEB. (Asteraceae), a vulnerable species in Poland. *Scripta Facultatis Rerum Naturalium Universitatis Ostraviensis*, 186, 231-235.
- Czarnecka B., **Ptaszyńska A.A.** 2008. Genetic diversity within the island population of *Senecio macrophyllus* M. BIEB. (Asteraceae), a vulnerable species in Poland. Materiały z IV Międzynarodowej Konferencji Naukowej, pt.: Environmental Changes and Biological Assessment, Ostrava, Czech Republic, 10-11th April, p. 11.

Bibliografia:

Zarzycki K. Mirek Z. 2006. Red list of plants and fungi in Poland. Czerwona lista roślin i grzybów Polski. Kraków: Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN.

Zarzycki K. (red.) Kaźmierczakowa R. 2001. Polska czerwona księga roślin. Paprotniki i rośliny kwiatowe. Kraków: Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN.

Zarzycki K., Kaźmierczakowa R., Mirek Z. 2014. Polska Czerwona Księga Roślin. Paprotniki i rośliny kwiatowe. Wyd. III. uaktualnione i rozszerzone. Kraków: Instytut Ochrony Przyrody PAN.

b. Grzyby mikroskopijne zasiedlające mszaki

Od 1 października 2007 rozpoczęłam pracę, jako adiunkt w Zakładzie Botaniki i Mykologii, Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS, gdzie pracuję do chwili obecnej. Początkowo zajmowałam się grzybami mikroskopijnymi zasiedlającymi mikronisze tworzone przez mszaki. W artykule przeglądowym oraz podczas Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej w Krasnobrodzie podsumowałam dotychczasowy stan wiedzy na ten temat.

- **Ptaszyńska A.A.**, Mułenko W. 2009. Mikronisze w relacjach pomiędzy grzybami i mszakami. Materiały z Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej, pt.: Interakcje międzygatunkowe na różnych poziomach organizacji: osobnik –

populacja – biocenoza. Rośliny naczyniowe a „bracia mniejsi”, Krasnobród, 22-25 czerwca, p. 36.

- **Ptaszyńska A.A.**, Mułenko W., Żarnowiec J. 2009. Bryophytes microniches inhabited by microfungi. *Annales UMCS, sectio C Biologia* 64, 35-43 (punkty MNiSW: 9).

c. Nosemoza pszczoły miodnej

Od 2010 rozpoczęłam współpracę z pracownikami Zakładu Biologii Eksperymentalnej i Środowiskowej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie: dr hab. Grzegorzem Borsukiem, prof. dr hab. Jerzym Paleologiem, dr hab. Krzysztofem Olszewskim i dr hab. Anetą Starchecką. Zespół ten zajmuje się szeroko pojętą apidologią. W związku ze światowym „kryzysem pszczół” i jego potencjalnymi konsekwencjami dla gospodarki i zachowania środowiska, badania z tego zakresu stały się priorytetowe. Obserwowana inwazja grzyba *N. ceranae*, który szybko poszerzył liczbę organizmów żywicielskich oraz rozprzestrzenił się na całym świecie, zagrażając owadom zapylającym, sprawiła, że zainteresowałam się mikrosporydiami. Wyniki badań dotyczących nosemoz stały się podstawą prezentowanego osiągnięcia naukowego oraz większości prac przedstawionych w dorobku naukowym. Warto dodać, że w Europie, problemów związanych z biologią i patogennością *N. ceranae* nie można rozpatrywać w oderwaniu od *N. apis*. Oprócz nowych metod rozróżniania *N. apis* i *N. ceranae* oraz wpływu rozwoju nosemozy na mikroorganizmy jelitowe pszczoły miodnej, które zostały przedstawione w osiągnięciu naukowym, zajmowałam się również badaniem oddziaływania różnych substancji na rozwój tej choroby.

Badania nad nosemozą rozpoczęłam od analizy danych dotyczących zakażeń na Lubelszczyźnie w latach 2001-2008 oraz od wstępnej analizy morfometrycznej zarodników *N. apis* i *N. ceranae*. Wyniki tych badań, a także przegląd technik mikroskopowych stosowanych w celu identyfikacji zarodników mikrosporydiów zostały przedstawione w pracach:

- **Ptaszyńska A.A.**, Borsuk G., Mułenko W., Olszewski K. 2012. Monitoring of nosemosis in the Lublin region and preliminary morphometric studies of *Nosema* spp. spores. *Medycyna Weterynaryjna* 68, 622-625 (punkty MNiSW: 10).

- **Ptaszyńska A.A.** 2014. The validation of microscopic techniques for identification and differentiation of Microsporidia. *European Journal of Medical Technologies* 1, 1-5 (punkty MNiSW: 7).

Następnie zajęłam się analizą tkanek i gruczołów pszczoły miodnej w celu rozpoznania i identyfikacji zarodników grzybów z rodzaju *Nosema*. W wyniku prowadzonych badań odnalazłam zarodniki *Nosema* spp. w gruczołach gardzielowych. Obecność zarodników w gruczołach zakłóca produkcję mleczka pszczelego i może być przyczyną horyzontalnego przenoszenia infekcji w rodzinie, w tym również do matki pszczoły.

Celem badań przedstawionych w Medycynie Weterynaryjnej było określenie korelacji między liczbą zarodników *Nosema* spp. w całej pszczole, w jelicie oraz w gruczołach gardzielowych. Badania te przedstawiono w czasopiśmie weterynaryjnym ze względu na ich wartość aplikacyjną i chęć rozpropagowania wyników wśród hodowców pszczół.

- **Ptaszyńska A.A., Borsuk G., Anusiewicz M., Mułenko W.** 2012. Location of *Nosema* spp. spores within body of honey bee. *Medycyna Weterynaryjna* 68, 618-621 (punkty MNiSW: 10).

Podczas wykonywania doświadczeń wchodzących w skład publikacji **P4** zaobserwowałam znaczący spadek pH w rozcierach wykonanych z pszczół zakażonych. Zmiana pH mogła być związana z samym rozwojem choroby, jak i z produktami przemiany materii mikroflory jelitowej. Jej skład był zaburzony rozwojem choroby. Postawiłam hipotezę, że spadek pH mógł wtórnie prowadzić do przyspieszenia rozwoju nosemozy. W celu weryfikacji tej hipotezy przeprowadziłam doświadczenia, w których sztucznie zmieniałam pH organizmu pszczoły dodając im do pokarmu alkohol etylowy. U pszczół, podobnie jak i innych owadów oraz kręgowców, etanol jest metabolizowany przez dehydrogenazę alkoholową (ADH) do aldehydu. Aldehyd przekształcany jest następnie w octan metylu przez dehydrogenazę aldehydową (ALDH), co może powodować zakwaszenie treści jelitowej. Dodatek etanolu, w stężeniu 5%, do syropu cukrowego stwarzał dogodne warunki dla szybszego rozwoju nosemozy. Natomiast, etanol w stężeniu 10% w syropie cukrowym, wywierał na pszczoły silne działanie toksyczne. Obserwowane zakwaszenie treści jelitowej pszczoły stwarzało warunki dogodne do rozwoju nosemozy. Prawdopodobną przyczyną tego faktu jest lepszy

dostęp zarodników do nabłonka jelita, osłabionego działaniem produktów przemiany etanolu. Wyniki badań zostały przedstawione w publikacji:

- **Ptaszyńska A.A.**, Borsuk G., Mułenko W., Olszewski K. 2013. Impact of ethanol on *Nosema* spp. infected bees. *Medycyna Weterynaryjna* 69, 736-740. (Impact Factor = 0,203; punkty MNiSW: 15)

Tematem moich badań była też suplementacja diety pszczół, jako czynnik przeciwdziałający rozwojowi nosemozy. Testowałam powszechnie dostępne preparaty, polecane przez producentów, jako dodatek do paszy zwierząt gospodarskich, w tym pszczół. Suplementacja testowanymi preparatami zamiast hamować, przyspieszyła rozwój nosemozy.

- **Ptaszyńska A.A.**, Borsuk G., Mułenko W., Wilk J. 2016. Impact of vertebrate probiotics on honeybee yeast microbiota and on the course of nosemosis. *Medycyna Weterynaryjna* 72, 430-434. (Impact Factor = 0,195; punkty MNiSW: 15).

W trakcie większości eksperymentów, przeprowadzonych na pszczołach niezbędne było szybkie, a jednocześnie sterylne pobieranie hemolimfy do analiz. Wraz z dr hab. G. Borsukiem oraz w ramach współpracy z dr Patcharin Krutmuang z Chiang Mai University (CMU), Faculty of Agriculture, Department of Entomology and Plant Pathology, Thailand, udoskonaliśmy metodę pozyskiwania hemolimfy od owadów z rodziny pszczołowatych (Apidae). Nowy, szybki oraz łatwy sposób umożliwiający sterylne pobranie hemolimfy od dorosłych pszczół został przedstawiony w pracy:

- Borsuk G., **Ptaszyńska A.A.**, Olszewski K., Domaciuk M., Krutmuang P., Paleolog J. 2017. A new method for quick and easy hemolymph collection from Apidae adults. *PLoS ONE* 12, e0170487. doi:10.1371/journal.pone.0170487 (Impact Factor: 3,54; punkty MNiSW: 40).

d. Poszukiwanie nowych metod eradykacji nosemozy

Jak do tej pory nie opracowano skutecznej metody ograniczania i zwalczania nosemoz u pszczoły miodnej. W związku z tym, ważnym aspektem moich badań, jest poszukiwanie nowych substancji, zarówno syntetycznych, jak i naturalnych

ograniczających rozwój choroby. Początkowo zajmowałam się substancjami dostarczonymi w ramach prac związanych z projektem „Nowy środek biobójczy z funkcją blokowania cyklu rozrodczego *Varroa destructor* do walki z warrozą pszczoły miodnej”, NCBiR POIG.01.03.01-02-047/12, który był realizowany w latach 2012-2014. W projekcie tym oprócz badania substancji skierowanych przeciwko *V. destructor* były również testowane związki syntetyczne, które mogłyby ograniczać rozwój nosemozy.

Następnie przedmiotem moich badań były porfiryny. Wyselekcjonowałam grupę najbardziej aktywnych porfiryn i określiłam wpływ światła na ich bioaktywność. Prace te stały się podstawą do napisania zgłoszenia patentowego nr P.408774; M. Trytek, A.A. Ptaszyńska, D. Gryko, G. Borsuk, pt. „Preparat do zastosowania w leczeniu mikrosporydioz, zwłaszcza nosemozy u pszczół” oraz projektu: „Aktywność biologiczna i mechanizmy działania związków porfiryńoidowych przeciwko wewnątrzkomórkowym patogenom pszczelim z rodzaju *Nosema*”, NCN, ID: 293789, który rozpoczął się w 2016 roku i jest realizowany obecnie do 2019 r.

Ponadto, wytykowałam bezpieczne dla pszczół i ludzi substancje pochodzenia roślinnego. Pobudzają one system odpornościowy owadów, wyrażony wzrostem aktywności oksydazy fenolowej i ograniczają rozwój nosemozy u pszczół. Wyniki badań stały się podstawą zgłoszenia patentowego nr P.415155; A.A. Ptaszyńska, G. Borsuk, D. Załuski, M. Cytryńska, W. Mułenko, A. Zdybicka-Barabas pt: „Preparaty roślinne do zastosowania w leczeniu nosemozy u pszczół i poprawy ich odporności”. Zgłoszenie zostało zakwalifikowane do drugiego etapu czwartej edycji konkursu „Eureka! DGP – odkrywamy polskie wynalazki”, a jego wartość aplikacyjną podkreśla fakt podpisania umowy dotyczącej udostępnienia produktu do testowania firmie Biowet Puławy Sp. z o.o. – „Umowa o przekazanie materiału do badań z dnia 25.07.2016, nr umowy 987/2016”.

Powyższe zgłoszenia patentowe uzyskały pozytywny raport Urzędu Patentowego stanowiący wstępną ocenę przedmiotu zgłoszenia. Zarówno w przypadku prac eksperymentalnych jak i wynalazków miałam wiodący udział w badaniach począwszy od koncepcji po opracowanie i publikowanie wyników. Jestem koordynatorem powyższych badań. Są one prowadzone we współpracy z kilkoma ośrodkami naukowymi, gdyż podjęte zadania, ze względu na ich wagę i nowatorskość, wymagają wspólnego działania specjalistów z wielu dyscyplin. Mikrosporydia to organizmy pasożytnicze słabo poznane, a ich wpływ na organizm gospodarza, wymaga dalszych

wielokierunkowych analiz. Z tego względu utworzono sieć badawczą skupiającą specjalistów z wielu dyscyplin, mających niezbędne doświadczenie naukowe oraz dysponujących specjalistycznym sprzętem. Tym samym uczyniłam znaczący krok w stronę komercjalizacji wyników badań i współpracy z otoczeniem społeczno-gospodarczych.

3. Udział w części eksperymentalnej innych badań

a. Nowoczesne metody obrazowania próbek biologicznych przy zastosowaniu skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM)

➤ Zmiany morfologiczne komórek grzyba *Candida albicans* poddanych działaniu ekstraktów otrzymanych z pelargonii (*Pelargonium zonale*)

Współpracowałam z dr hab. M. Fiołką (UMCS), przy analizie wpływu, ekstraktów otrzymanych z pelargonii (*Pelargonium zonale*), na zmiany morfologiczne komórek grzyba *Candida albicans*. Efektem tej pracy było odnotowanie istotnego obniżenia aktywności metabolicznej komórek drożdżaków poddanych działaniu ekstraktu.

- Lewtak K., Fiołka M.J., Szczuka E., **Ptaszyńska A.A.**, Kotowicz N., Kołodziej P., Rzymowska J. 2014. Analysis of antifungal and anticancer effects of the extract from *Pelargonium zonale*. *Micron* 66, 69-79, doi: 10.1016/j.micron.2014.06.001. (Impact Factor = 1,838; punkty MNiSW: 30).

➤ Badania dotyczące zmian w strukturze białek glutenowych wywołanych przez preparaty błonnikowe

W ramach współpracy z dr Agnieszką Nawrocką z Zakładu Fizycznych Właściwości Materiałów Roślinnych, Laboratorium Oceny Jakości Surowców Zbożowych i Oleistych, Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie brałam udział w badaniach dotyczących zmian w strukturze białek glutenowych. Zaobserwowane zmiany były wywołane przez preparaty błonnikowe, które doprowadzały do interakcji między polisacharydami, a glutenem.

- Nawrocka A., Szymańska-Chargot M., Miś A., **Ptaszyńska A.A.**, Kowalski R., Waśko P., Gruszecki W. I. 2015. Influence of dietary fibre on gluten proteins structure – a study on model flour with application of FT-Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*. 46, 309-316 doi: 10.1002/jrs.4648 (Impact Factor: 2,519; punkty KBN: 30).

b. Analiza filogenetyczna

➤ **Badania bakterii brodawkowych *Astragalus glycyphyllos***

Uczestniczyłam również w badaniach cech fenotypowych i analizie pokrewieństwa filogenetycznego symbiontów *Astragalus glycyphyllos* w oparciu o polimorfizm 16S rDNA i analizę sekwencji 16S rDNA. Badania te pozwoliły sklasyfikować symbionty *A. glycyphyllos* w rodzaju *Mesorhizobium*.

- Gnat S., Wójcik M., Wdowiak-Wróbel S., Kalita M., **Ptaszyńska A.A.**, Małek W. 2014. Phenotypic characterization of *Astragalus glycyphyllos* symbionts and their phylogeny based on the 16S rDNA sequences and RFLP of 16S rRNA gene. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 105, 1033-48. doi: 10.1007/s10482-014-0163-y. (Impact Factor = 2,072; punkty MNiSW: 20).

➤ **Badania roztoczy *Varroa destructor***

W trakcie realizacji prac związanych z projektem KBN nr N N311, "Genetyczna identyfikacja oporności na tau-fluwalinat roztoczy *Varroa destructor* pochodzących z pasiek wschodniej Polski", zajmowałam się określaniem pokrewieństwa genetycznego pomiędzy roztoczami pobranymi w różnych rejonach Polski.

4. Zgłoszenia patentowe

- a. 2014 r. Zgłoszenie patentowe nr P.408774. Preparat do zastosowania w leczeniu mikrosporydioz, zwłaszcza nosemozy u pszczół. M. Trytek – 35%; A.A. Ptaszyńska – 25%; D. Gryko – 30%; G. Borsuk – 10%.
- b. 2015 r. Zgłoszenie patentowe nr P.415155. Preparaty roślinne do zastosowania w leczeniu nosemozy u pszczół i poprawy ich odporności. A.A. Ptaszyńska – 55%, M. Cytryńska – 5%; W. Mułenko – 5 %, A. Zdybicka – Barabas – 5 %; G. Borsuk – 15%; D. Załuski – 15%.

5. Inne realizowane obecnie zadania badawcze

Po zakończeniu moich badań opisanych w **P6**, w których zaobserwowano negatywny wpływ suplementacji diety pszczół komercyjnymi bakteriami probiotycznymi *Lactobacillus rhamnosus* oraz prebiotykiem – inuliną, podjęłam prace dotyczące otrzymania preparatu probiotycznego przeznaczonego dla pszczół. Przy współpracy z prof. dr hab. Wandą Małek (UMCS), dr hab. Grzegorzem Borsukiem (UP w Lublinie) oraz z prof. dr hab. Łucją Łaniewską-Trokenheim (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie) wyizolowaliśmy 17 szczepów bakterii probiotycznych, które mogą być stosowane w suplementacji diety u pszczół. Wyizolowane bakterie zostały przebadane pod kątem biochemicznym i genetycznym. Obecnie wraz z firmą Biowet Puławy Sp. z o.o. prowadzimy badania nad otrzymaniem specjalnego preparatu probiotycznego przeznaczonego specjalnie dla pszczół.

6. Plany badawcze

Patogeny pszczoły miodnej, *N. apis* i *N. ceranae*, wciąż stanowią wyzwanie dla współczesnej nauki. Nie do końca wyjaśniono ich wpływ na fizjologię pszczół, specyficzność tkankową czy też sam mechanizm infekcji. Opisywane są rasy pszczół bardziej odporne na zarażenie, nie jest jednak znany mechanizm i podłoże tej odporności. W trakcie dalszej pracy planuję zbadać dynamikę zakażeń pszczół powodowanych przez *N. apis* i *N. ceranae*, a także wpływ substancji naturalnych oraz

syntetycznych na rozwój choroby. Moje działania będą również zmierzały do upowszechnienia i wdrożenia zgłoszonych wynalazków przy współpracy przedsiębiorcami.

VI. Podsumowanie aktywności naukowej

Mój dotychczasowy dorobek składa się z 25 prac naukowych, 16 z nich zostało opublikowanych w czasopismach z bazy JCR, takich jak: Journal of Invertebrate Pathology, Medycyna Weterynaryjna (Veterinary Medicine – Science and Practice), Journal of Insect Science, Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, Micron, FEMS Microbiology Letters, Journal of Apicultural Research, Journal of Raman Spectroscopy, Parasitology Research i PLoS ONE. Jestem autorką lub współautorką 28 komunikatów zjazdowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

Przedstawione w Tabeli 3 dane bibliometryczne dokumentują mój rozwój naukowy. Według bazy „*Web of Science*” h-indeks prac z mojego dorobku naukowego wynosi 5, a średnia liczba cytowań przypadająca na jedną pracę to 4,53. Pozostałe osiągnięcia w zakresie pracy naukowej, dydaktycznej, popularyzatorskiej i organizacyjnej zostały przedstawione w załączniku 3 do niniejszego wniosku.

Tabela 3. Dane bibliometryczne

		IF ^a	IF _{5lat}	Punkty MNIŚW ^b	Punkty MNIŚW ₂₀₁₆
Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe	6 publikacji	11,039	10,446	155	150
Autorstwo lub współautorstwo publikacji naukowych w czasopismach znajdujących się w bazie <i>Journal Citation Reports</i> (JCR) (z wyłączeniem prac wchodzących w skład osiągnięcia)					
A\ przed uzyskaniem stopnia doktora	1 publikacja	2,049	2,419	32	40
B\ po uzyskaniu stopnia doktora	7 publikacji	11,692	11,508	195	195
Autorstwo lub współautorstwo publikacji naukowych w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazach lub na liście JCR:					
A\ przed uzyskaniem stopnia doktora	5 publikacji	-	-	14	30
B\ po uzyskaniu stopnia doktora	4 publikacje	-	-	19	22
Łączna liczba publikacji	25 publikacji	24,780	24,373	415	437

Liczba komunikatów zjazdowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych:

A\ przed uzyskaniem stopnia doktora	6 komunikatów
B\ po uzyskaniu stopnia doktora	22 komunikatów

Pozostałe dane bibliometryczne	
Łączna liczba cytowań (wg. bazy Web of Science):	68
Liczba cytowań (WoS) z wyłączeniem autocytowań:	53
Indeks Hirscha (h) (wg. bazy Web of Science):	5
Średnia liczba cytowań przypadająca na jedną pracę (wg. bazy Web of Science):	4,53
Liczba projektów badawczych	1 NCN, 1 NCBiR, 1 KBN

^a IF zgodny z rokiem ukazania się pracy,

^b punkty MNIŚW wg wykazu obowiązującego w roku opublikowania

Lublin, 29.03.2017

.....

 Podpis wnioskodawcy