

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Anny Dworak**  
**„Analiza interakcji między kukurydzą Bt, szkodnikami niedocelowymi i ich drapieżcami**  
**w różnych warunkach środowiska”**

**Wprowadzenie**

Mgr. inż. Anna Dworak jest trzecią doktorantką zajmującą się oceną oddziaływania genetycznie zmodyfikowanych roślin (*genetically modified - GM*) na środowisko w obecnym Samodzielnym Zakładzie Entomologii Stosowanej SGGW w Warszawie. Pierwsze badania rozpoczęte w 2004 r. dotyczyły weryfikacji metod i technik stosowanych do oceny przepływu toksycznego białka Cry 1 Ab pomiędzy układami troficznymi w warunkach testów laboratoryjnych a następane prace ograniczały się do porównania wyników testów laboratoryjnych do wyników badań polowych dla jednej grupy drapieżców – biegaczowatych (Carabidae). Mgr. A. Dworak korzystając z tamtego dorobku (jedynego w Polsce dla tego typu badań) poszerzyła zakres badań o doświadczenia polowe i łącznego wpływu czynników biotycznych i abiotycznych na reakcję kukurydzy z cechą MON 810 na czynniki stresowe. Rozszerzenie badań do większej grupy drapieżców żerujących na fitofagach kukurydzy pozwoliło na krytyczną ocenę metodyki badań laboratoryjnych nad oddziaływaniem toksycznego białka Cry 1Ab na organizmy niedocelowe. Wieloletni konflikt, szczególnie pomiędzy badaczami szwajcarskimi, wynikał ze stosowania technik „bez wyboru pokarmu – no choice tests) i mylenia oddziaływania bezpośredniego białka Cry 1Ab na drapieżce i parazytoidy z oddziaływaniem pośrednim „podtrutych” fitofagów jako pokarmu gorszej jakości.

Należy podkreślić, że prowadzone badania wypełniają lukę w literaturze krajowej dotyczącej roślin zmodyfikowanych genetycznie, a włączenie problematyki łącznego stresu abiotycznego (deficytu wody) i biotycznego oddziaływujących na rośliny wychodzą naprzeciw problemom globalnym związanym ze zmianami klimatycznymi i nieregularnymi opadami. Problem deficytu wody dla potrzeb produkcji rolniczej i ogrodnictwa staje się ważnym również w Polsce.

**Ogólne uwagi o rozprawie**

Recenzowana rozprawa liczy 160 stron, na których zamieszczony jest tekst pracy, 39 ilustracji składających się z 2 – 6 wykresów lub fotografii, 17 tabel i spisu literatury liczący 299 pozycji i 17 publikacji zawartych w 17 źródłach internetowych, w pełni oddający aktualny stan wiedzy w tym zakresie. Recenzent utrzymujący kontakty robocze ze

wszystkimi ośrodkami naukowymi w Europie i mający dostęp do aktualnych publikacji z tego zakresu, natrafił w rozprawie A. Dworak na nowe cytowania. Przy ocenie wartości rozprawy należy zwrócić też uwagę na datę rozpoczęcia planowania badań przez mgr. A. Dworak (wtedy A. Czapla) na rok 2009. W obecnej rozprawie odnosząc wyniki swoich badań do prac innych europejskich autorów opublikowanych do 2015 r., nie oddaje w pełni ich innowacyjności w tamtym okresie. Przykładem może być duże zainteresowanie (w tym pracowników Zespołu GMO Europejskiej Agencji Bezpieczeństwa Żywności -EFSA) jej posterem nad przepływem toksycznego białka Cry 1 Ab pomiędzy poziomami troficznymi w warunkach polowych w czasie konferencji „5th Ecological Impact of Genetically Modified Organisms” (Czechy, 2011).

Jak wyżej zaznaczono, badania mgr. A. Dworak objęły szeroki zakres tematyczny;

- (a) ilościowa całościowa ocena przepływu toksycznego białka Cry 1Ab pomiędzy poziomami troficznymi roślina – fitofagi i ich drapieżce;
- (b) ocena efektu plejotropowego, niezamierzonego efektu transformacji na fizyczne i chemiczne właściwości kukurydzy GM na jej akceptację i parametry populacyjne dwóch gatunków mszyc;
- (c) zmiany potencjału antyoksydacyjnego roślin 3 odmian kukurydzy w reakcji na żerowanie mszycy różano-trawowej i
- (d) zmiany potencjału antyoksydacyjnego roślin 3 odmian kukurydzy w reakcji na żerowanie przędziorka chmielowca, suszę glebową i łączne działanie obu tych czynników stresowych.

### **Przegląd literatury**

Mgr. A. Czapla poświęciła wiele uwagi na całościowe przedstawienie konsekwencji szybkiego wzrostu uprawy kukurydzy w Polsce na jej zagrożenie przez fitofagi. Omacnica prosowianka, szkodnik notowany 10 lat temu tylko na terenie Polski południowej jest obecnie ważnym szkodnikiem kukurydzy prawie w całym kraju. Gatunki do tej pory wymieniane tylko w pracach faunistycznych jak wciornastki, przędziorek chmielowiec, słonecznica orężówka czy wieczernica szczawiówka coraz częściej występują lokalnie w coraz liczniejszych populacjach. Ze względu na przedmiot badań, Autorka opisuje dokładnie biologię i szkodliwość mszycy czeremchowo-zbożowej i mszycy różano-trawowej. Opis działania transgenicznej kukurydzy, szczególnie z cechą MON 810 na szkodniki, wzrost jej uprawy w świecie czy charakterystyka zawartości toksycznego białka Cry 1 Ab odpowiada potrzebom jej odniesienia do wyników uzyskanych w pracy doktorskiej.

Takie 4-o stronicowe rozdziały jak „Niezamierzone zmiany w metabolizmie kukurydzy Bt i ich potencjalny wpływ na zachowanie i rozwój wybranych organizmów niedocelowych”; „Reakcje roślin w następstwie stresu żerowania szkodnika” czy „Zaangażowanie enzymów antyoksydacyjnych w usuwaniu RFT powstających pod wpływem stresów środowiskowych” są gotowymi manuskryptami do naukowych publikacji przeglądowych, a przynajmniej jako materiał wykładowy dla magistrantów kilku kierunków studiów.

### **Material i metody**

Zastosowane metody i techniki poszczególnych doświadczeń są poprawne, w wielu z nich wykorzystano modyfikacje naszych badań prowadzonych od 2004 r. nad kukurydzą GM. Na uwagę zasługuje duża reprezentacja badanych gatunków fitofagów i ich wrogów naturalnych w próbach przeznaczonych do analiz zawartości białka Cry 1 Ab zebranych w doświadczeniach polowych jak: 150 osobników mszycy różano-trawowej w 24 próbach (2009); 1989 osobników wciornastków i przędziorka chmielowca w 20 próbach, 134 osobników drapieźców w 26 próbach (2010) i 483 osobników wybranych gatunków fitofagów i ich drapieźców w 73 próbach w 2011 r.

Zastosowano powszechnie już stosowane metody w badaniach nad akceptacją i rozwojem mszycy różano-trawowej i mszycy zbożowej na roślinach 3 odmian kukurydzy, szczególnie ważnych przy ocenie elementów bionomii i wyznaczaniu parametrów populacyjnych. Dzięki ustalonej współpracy pomiędzy promotorem, prof. dr M. Kielkiewicz-Szaniawską a pracownikami Katedry Biochemii SGGW, metody zastosowane przez mgr. A. Dworak przy ocenie potencjału antyoksydacyjnego roślin kukurydzy są właściwe dla tego typu badań.

### **Wyniki badań**

Dla oceny znaczenia uzyskanych wyników badań przez mgr. A. Dworak należy pamiętać, że przez wiele lat mieliśmy ograniczoną wiedzę nad oddziaływaniem roślin z genami *Bacillus thuringensis* na środowisko w Europie. W USA ograniczały się one początkowo do badań polowych i laboratoryjnych nad ich oddziaływaniem na faunę motyli, szczególnie po sensacyjnej publikacji Losey'a i wsp. (1999) dotyczącej wpływu kukurydzy Bt (Event 176) na śmiertelność larw motyla monarcha (uważanego w USA za gatunek symboliczny, dosłownie 'charismatic').

W latach 2002 – 2008 podjęto intensywne badania (najczęściej laboratoryjne i szklarniowe) nad wpływem kukurydzy z cechą Event 176 i MON 810 na organizmy niedocelowe w Europie. Jednak ich interpretacja przez różne ośrodki badawcze nie była

pełna. Dlatego wyniki przedstawione w rozprawie mgr. A. Dwortak są ważne dla krytycznej oceny wyników dotychczasowych badań prowadzonych nad wpływem roślin GM na środowisko. Np. jej stwierdzenie o znacznej zmienności w zawartości białka Cry 1 Ab w liściach kukurydzy w zależności od sezonu, lokalizacji i wieku roślin. Jej wyniki potwierdziły też dane opublikowane w tym samym czasie dla innych krajów. Jeżeli do tego dodać obecne informacje dostarczone przez firmę Monsanto, że 5 – 6 % roślin odmian z cechą Bt uprawianych w polu może nie wykazywać ekspresji toksycznego białka Cry 1 Ab, to może to silnie zmieniać interpretację wyników różnych doświadczeń.

Ważnym jest też stwierdzenie, że zawartość białka Cry 1 Ab w liściach kukurydzy Bt zwiększa się istotnie pod wpływem zarówno stresowych czynników biotycznych jak i abiotycznych, występujących pojedynczo czy łącznie. Stres suszy glebowej (4 dni) spowodował prawie dwukrotne podwyższenie poziomu białka Cry 1 Ab w liściach kukurydzy Bt. Przedłużenie o następne 2 dni stresu suszy (pojedynczego lub w połączeniu ze stresem biotycznym) skutkowało jeszcze silniejszym wzrostem zawartości toksyny w liściach. Recenzent przywiązuje znaczną wagę do tych analiz wielokrotnie obserwując w Afryce, że zaatakowane przez młode gąsienice drążące żdźbła kukurydzy odmiany konwencjonalne zasychały i zamierały w warunkach niedoboru wody. Uprawa odmian Bt może więc powstrzymać to zjawisko, nawet jeżeli jeden z tych trzech gatunków motyli (*Chilo*, *Busseola* czy *Sesamia* sp.), wykaże mniejszą reakcję na działanie toksyny Cry 1 Ab

Dla badań ekologicznych ważnym jest stwierdzenie, że w ciałach roztoczy zasiedlających rośliny Bt oznaczono od 10 do 50 krotnie wyższe stężenie białka Cry niż ciałach wciornastków. Owady pożyteczne, w tym biedronki, zebrane z roślin kukurydzy Bt zasiedlonych przez wciornatki, zawierały więcej białka Cry niż ofiary. Larwy biedronek (wrzeciążki i pięciokropki) kumulowały 3-4 razy więcej toksyny Cry niż owady dorosłe. Chociaż 4 spośród 5 badanych gatunków biedronek to generaliści, to przeważającą część ich diety (zgodnie z literaturą – 85%) stanowią mszyce, które nie pobierają białka Cry z floemu roślin transgenicznych. Autorka zakłada, że spektrum pokarmowe tych gatunków biedronek musi obejmować inne gatunki roślinożerców, a po kwitnieniu z przypadkowej kontaminacji pyłkiem lub odżywianiem się kwiatostanami męskimi. Jednak analiza zawartości toksycznego białka Cry w licznych badanych gatunkach drapieżców wykazała zmniejszający się jego poziom w kolejnych ogniwach łańcucha troficznego.

Uważam, że rozdziały poświęcone potencjałowi obronemu kukurydzy na żerowanie mszycy różano-trawowej, przędziorka chmielowca i stresu deficytu wodnego wnoszą wiele ciekawych i ważnych informacji dla nauki. Autorka potwierdziła, specyficzne zaangażowanie

enzymów antyoksydacyjnych w przystosowaniu różnych odmian kukurydzy (w tym odmian Bt) do krótko trwających stresów o różnym charakterze (abiotycznych i biotycznych) występujących pojedynczo lub łącznie.

**Jednak pojawia się pytanie:** jeżeli wśród badanych 3 odmian kukurydzy obserwowano różnice w tych reakcjach obronnych, to czy można wskazać na ogólny mechanizm tych zmian i czy można je ekstrapolować na inne nowe odmiany kukurydzy Bt ??? W czasie dyskusji grupy roboczej „Environmental risk assessment” sieci EFSA (Parma, 31.05. – 1.06.2016) poruszono problem wpływu zmienności genetycznej roślin kukurydzy (do 50%) na wyniki badań nad ich oddziaływaniem na środowisko.

Łączy się to też z **drugą uwagą** Recenzenta: dlaczego tytuł rozprawy budzi jego zastrzeżenia ??? i w obecnych publikacjach nie powinien on być tak formułowany ???

### **Wnioski**

Osiem wniosków (w tym jeden rozbudowany prawie na całą stronę A4) oddają najważniejsze wyniki prowadzonych badań. Biorąc pod uwagę przedstawione wyżej uwagi Recenzenta o genetycznej zmienności odmian kukurydzy, rozumie uzasadnienie ostrożności Autorki przed generalizowaniem uzyskanych danych do prawd ogólnych.

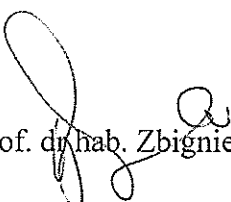
### **Uwagi ogólne**

Recenzent będąc promotorem dwóch innych prac nad oddziaływaniem roślin GM z cechą MON 810 na organizmy niedocelowe docenia znaczne rozszerzenie zakresu badań zaplanowanych przez doktorantkę, włączenie bardzo pracowitych obserwacji nad parametrami rozwoju populacji mszyc na odmianie kukurydzy GM i prowadzenie licznych analiz biochemicznych. Rozprawa została starannie przygotowana, co może wynikać też ze znanej staranności jej promotora. Zastosowane metody badawcze wymagały od doktorantki znajomości technik badań entomologicznych i analityczno – biochemicznych. Na uwagę zasługuje wykorzystanie metod interdyscyplinarnych i współpracy z zespołami biochemików (SGGW) i Laboratorium Kontroli Genetycznie Modyfikowanych Organizmów (IHAR w Radzikowie).

Nieliczne błędy literowe należące do tych samych słów o innym znaczeniu, których nie „wyłapał” program korekcyjny, zostaną usunięte w czasie przygotowywania publikacji naukowych; polecanych w j. angielskim. Ich publikacja jest o tyle ważna, aby pokazać wyniki badań nad roślinami transgenicznymi prowadzonych nad rodzimymi gatunkami w Polsce. Obecny zakaz uprawy tych odmian w Polsce, przy braku odmian odpornych

kukurydzy uzyskanych metodami hodowli klasycznej i problemami z wysoką skutecznością innych metod ochrony roślin kukurydzy, zostanie zmieniony pod presją konkurencyjności polskiego i europejskiego rolnictwa.

**Uważam**, że przedstawiona rozprawa spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim i stawiam wniosek do Rady Wydziału Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu SGGW do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
Prof. dr hab. Zbigniew T. Dąbrowski

14. 06. 2016 r.