

Prof. dr hab. Bogumił Leszczyński
Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej
Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny
w Siedlcach

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Dworak

pt. „Analiza interakcji między kukurydzą Bt, szkodnikami niedocelowymi i ich drapieżcami w różnych warunkach środowiska”

Alternatywne metody, stosowane w ramach integrowanej ochrony roślin, stanowią przeciwwagę dla chemizacji produkcji roślinnej, intensywnie rozwijanej przez ostatnie dziesięciolecie. Oczywiście, wszyscy poważni gracze w tym obszarze, a więc producenci, konsumenci, naukowcy i decydenci zdają sobie sprawę z faktu, że całkowite wyeliminowanie chemicznych środków ochrony roślin nie jest aktualnie możliwe. Jednak znaczne ich ograniczenie na rzecz metod alternatywnych takich jak: walka biologiczna, naturalna odporność roślin czy stosowanie biopestycydów, już na pewno tak. W tą koncepcję wpisuje się także wykorzystanie odmian roślin genetycznie zmodyfikowanych (GMO), które natrafia jednak na wielki opór instytucji europejskich, rządów niektórych krajów członkowskich oraz opinii publicznej. Działania te są umiejętnie podsycane przez różnego rodzaju lobby, często reprezentujące producentów pestycydów, zorganizowane grupy promujące interesy protekcyjnistyczne, zaniepokojonych konsumentów (świadomie wprowadzanych w błąd) oraz organizacje i ruchy nie zgadzające się na wprowadzanie do środowiska nowych organizmów, mogących ich zdaniem naruszyć równowagę biologiczną lub wywołać bliżej nieokreślone skutki w przyszłości. W tej ożywionej dyskusji niewiele jest poważnych argumentów naukowych, co m.in. wynika z bardzo ograniczonych prac nad wpływem GMO na środowisko. Badania takie są trudne do przeprowadzenia, ponieważ ciężko jest uzyskać pozwolenie na doświadczenia z udziałem roślin genetycznie modyfikowanych, w naturalnych warunkach polowych. Ponadto, wymagają one dłuższego okresu oceny interakcji środowiskowych, z udziałem organizmów docelowych i towarzyszących im organizmów niedocelowych.

Uwagi ogólne

W tej sytuacji, należy bardzo docenić starania Autorki recenzowanej rozprawy, która w latach 2009-2011, jeszcze przed wprowadzeniem całkowitego zakazu uprawy roślin GMO w warunkach polowych w Polsce, postanowiła zbadać powyższe interakcje. Niewątpliwą zaletą ocenianej pracy jest także jej wielowątkowy charakter, wynikający z mnogości badanych aspektów, do których zaliczam: 1) oddziaływania na szkodniki docelowe i towarzyszące im organizmy niedocelowe; 2) oddziaływania na łańcuch troficzny: kukurydza-szkodnik-drapieżca; 3) oddziaływania na stres biotyczny; 4) oddziaływania na stres abiotyczny; 5) oddziaływania na stres łączny (czynnik biotyczny + czynnik abiotyczny); 6) wpływ na zawartość białka

rozpuszczalnego; 7) wpływ na zawartość związków fenolowych; 8) wpływ na zawartość krzemu; 9) wpływ na aktywność systemu antyoksydacyjnego. Należy także zauważyć, że Doktorantka pokusiła się również o analizę interakcji pomiędzy różnymi badanymi czynnikami, co dodatkowo podnosi wartość prezentowanej rozprawy.

Praca liczy 161 stron komputeropisu; w tym wstęp i cel pracy, które zostały przedstawione na trzech stronach, rozdział „Przegląd literatury” obejmuje 36 stron, wykorzystany materiał oraz zastosowane metody zostały scharakteryzowane na 25 stronach, wyniki zamieszczono na 42 stronach, dyskusja zajmuje 26 stron dysertacji, a wnioski dwie strony. Bibliografia obejmuje 299 pozycji, w ogromnej większości anglojęzycznych, dobrze dobranych i prawidłowo wykorzystanych w rozprawie. Materiał ilustracyjny przedstawiono w 17 tabelach oraz na 39 rysunkach i opatrzone poprawnym komentarzem. Rozprawa została przygotowana starannie, jest napisana zrozumiałym, specjalistycznym językiem, a wyniki są prezentowane w przejrzysty sposób. Układ pracy można uznać za klasyczny dla rozpraw doktorskich, ponieważ zawiera ona wszystkie elementy, typowe dla prac kwalifikacyjnych. Prezentowane w ocenianej rozprawie zagadnienia stanowią fragment badań prowadzonych od szeregu lat w Katedrze (obecnie Zakład) Entomologii Stosowanej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Merytoryczna ocena rozprawy

W krótkim, 3-stronnicowym wstępie Autorka umiejętnie wprowadza Czytelnika w zagadnienia uprawy kukurydzy na terenie Polski oraz informuje na jakie stresy środowiskowe jest narażona ta roślina. Kolejne wiersze poświęcone są transgenicznym liniom kukurydzy, zwłaszcza Bt, z ekspresją genu *cry1Ab*, której wynikiem jest obecność białka Cry1Ab w tkankach kukurydzy oraz jego potencjalnemu wpływowi na szkodliwe stawonogi docelowe i towarzyszące im organizmy niedocelowe. W końcowej części tego rozdziału przedstawiono trzy hipotezy badawcze, które postanowiła zweryfikować Doktorantka. Pierwsza zakładała spadek stężenia białka Cry1Ab w tkankach organizmów tworzących kolejne ogniwa badanego łańcucha troficznego (kukurydza Bt - szkodnik- drapieżca). Druga, brak różnic w biologii i parametrach populacyjnych dwóch gatunków mszyc zbożowych (*M. dirhodum* i *S. avenae*), po zasiedleniu roślin transgenicznej i nietransgenicznej kukurydzy). Trzecia, różnice w aktywności enzymów antyoksydacyjnych w tkankach badanych kukurydzy, w odpowiedzi na biotyczny (przędziorek chmielowiec, mszyca różanotrawowa), abiotyczny (susza glebowa) i łączny stres środowiskowy. Wszystkie hipotezy zostały precyzyjnie sformułowane, co pozwoliło Autorce na wyraźne określenie celu prezentowanej rozprawy.

Rozdział „Przegląd literatury” (dlaczego nie piśmiennictwa naukowego?) składa się z 8 podrozdziałów, które zostały przygotowane z dużym znanstwem omawianych zagadnień i wykorzystaniem najnowszych danych. Autorka omówiła w nim wyczerpująco: 1) zagrożenie upraw kukurydzy w Polsce przez roślinożerne stawonogi; 2) znaczenie transgenicznej kukurydzy Bt w odporności na szkodnika docelowego

(omacnica prosowianka); 3) niezamierzone zmiany w metabolizmie kukurydzy Bt i ich potencjalny wpływ na organizmy niedocelowe; 4) strategie obronne roślin przeciwko szkodnikom; 5) reakcje roślin na stres będący wynikiem żerowania szkodnika; 6) reakcje roślin na stres suszy glebowej; 7) reakcje roślin na stres łączny; 8) udział wybranych enzymów antyoksydacyjnych w usuwaniu stresu oksydacyjnego, powstającego pod wpływem czynników biotycznych i abiotycznych. Doktorantka wykazała się bardzo dobrym rozeznaniem w literaturze przedmiotu, cytując aktualne prace, szeregu zespołów badawczych, zajmujących się tą problematyką, chociaż niektóre fragmenty tekstu nie mają bezpośredniego związku z pracą (np. opis cykli rozwojowych mszyc str. 14-15). Autorka nie uniknęła także, w tej części rozprawy drobnych potknięć i błędów takich jak:

- brak standardu cytowań (raz system cyfrowy, innym razem nazwiska autorów),
- mszyce nie odżywiają się zawartością tkanki floemowej (str. 12) tylko sokiem floemowym,
- afidolodzy powszechnie używają terminu „narządy gębowe”, a nie „aparaty gębowe mszyc”,
- rośliny raczej nie emanują związków lotnych tylko je uwalniają, wydzielają lub emitują,
- sitowie to jednak nie elementy sitowe (str. 36),
- system detoksyfikacyjny ostatnio określany jest mianem systemu detoksykacyjnego,
- „podniesiona ekspresja genów” brzmi dziwnie,
- wreszcie zamiast węglowodany (str. 42) powinno być cukrowce.

W rozdziale „Materiał i metody” Doktorantka z wielką starannością opisała materiał użyty do badań, pobieranie prób oraz zastosowane metody badawcze. Recenzent jest pod wrażeniem mnogości różnych wariantów obserwacji, zaproponowanych testów oraz wykorzystanych technik analitycznych, które dają bardzo dobry obraz kwalifikacji i ogromnej pracowitości Doktorantki. Opis omawianych w tej części pracy zagadnień przedstawiono poprawnie, chociaż Recenzent ma również szereg uwag krytycznych:

- 1) W pkt. 3.1.1 tego rozdziału (str. 43) Autorka podaje, że badania przeprowadzono na izogenicznej odmianie kukurydzy DKC 3420, Monsanto, jej transgenicznej linii Bt DKC 3421 YG, Monsanto oraz na dwóch odmianach referencyjnych Bosman i Wigo (Hodowla Roślin Smolice); w pracy jednak nie znalazłem żadnych danych dla odm. Wigo
- 2) Poważne wątpliwości Recenzenta budzi sposób pobierania i transportu prób do laboratorium (a przecież ten etap w decydujący sposób rzutuje na wyniki), często z dużych odległości (Głuchów, Szymanów). Liście po ścięciu były bowiem przewożone w przenośnej lodówce, następnie myte i dopiero *post factum* zamrażane w temp. -70°C . Ten sposób postępowania z materiałem roślinnym, w kontekście testowania wpływu stresów środowiskowych nie jest najszcześniejszy, ponieważ Autorka mimowolnie wprowadziła do badań jeszcze dodatkowo stres antropologiczny.

- 3) Wątpliwości Recenzenta budzi również ogromna zmienność schematu doświadczeń, nawet biorąc pod uwagę fakt, że celem doktorantki było badanie „interakcji ... w różnych warunkach środowiska” oraz to, że musiała zmierzyć się z ogromną bioróżnorodnością istniejącą na obszarze badań. Przykładowo, w 2009 określiła zawartość białka Cry 1Ab tylko w tkankach 3 gatunków drapieżców; w 2010 w tkankach liści kukurydzy, 2 gat. szkodników niedocelowych oraz 8 gat. drapieżców, a w 2011 w tkankach liści kukurydzy, 3 gat. szkodników niedocelowych oraz 8 gat. drapieżców. Przy czym kompletne dane dla 3 sezonów badań znalazłem tylko dla jednego gatunku - złotooka pospolitego (Tab. 7, 8, 9). Do tego można dodać, że niektóre próby organizmów szkodliwych i pożytecznych były oparte nawet na pojedynczych osobnikach (Tab. 5).
- 4) Recenzent od lat krytykuje test „wolnego wyboru” przeprowadzany przy pomocy krążków liści wycinanych (uszkodzonych) korkoborem. Uważam, że wyniki testu byłyby znacznie bardziej wiarygodne, gdyby został on przeprowadzony na inaczej przygotowanej arenie lub z użyciem odpowiednich klimateczek.
- 5) Wydaje się także, że znacznie lepszą i dokładniejszą metodą oznaczenia zawartości wody i suchej masy w badanym materiale byłaby liofilizacja.

Mam również szereg drobnych uwag do tego rozdziału takich jak:

- wymienianie (po przecinkach), w tytułach podrozdziałów, poszczególnych lat badań,
- przeliczanie wyników niektórych badań na jednego osobnika, gdy z Tab. 5 wyraźnie wynika, że różniły się one znacznie masą,
- używanie zwrotów „w ciałach” zamiast w tkankach; czy „rośliny porażone” w przypadku zasiedlenia lub ataku szkodliwych owadów,
- częste powtarzanie informacji o badanych kukurydzach, w kolejnych podrozdziałach,
- zastosowanie przestarzałych i mało specyficznych metod oznaczania azotu ogólnego i związków fenolowych.

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka na ogół poprawnie skomentowała uzyskane rezultaty, koncentrując się najpierw na porównaniu zawartości białka Cry 1Ab w tkankach organizmów tworzących łańcuch troficzny kukurydza – szkodnik – drapieżca. Potwierdzając hipotezę zakładającą spadek zawartości tego białka w kolejnych ogniwach łańcucha troficznego. W tej części tego rozdziału zwracam raz jeszcze uwagę na ogromną zmienność badanego materiału oraz często niewielkie próby, co moim zdaniem znacząco utrudnia interpretację uzyskanych wyników.

Kolejna część tego rozdziału prezentuje wyniki eksperymentów szklarniowych i laboratoryjnych, przeprowadzone z udziałem szkodników niedocelowych, żerujących w elementach sitowych (mszyca różano-trawowa) lub w mezofilu (przędziorek chmielowiec, wciornastek zachodni). Autorka stwierdziła obecność białka Cry 1Ab w tkankach przędziorka chmielowca i wciornastka zachodniego oraz istotny wzrost jego zawartości w liściach kukurydzy pod wpływem żerowania mszycy, *Metopolophium*

dirhodum. Ponownie interpretację tych wyników utrudnia znaczna zmienność w doborze materiału do badań, podczas poszczególnych sezonów wegetacyjnych.

W innym doświadczeniu laboratoryjnym zbadano wpływ żerowania przędziorka chmielowca, 6-dniowej suszy glebowej oraz ich łącznego wpływu na zawartość białka Cry 1Ab w tkankach liści kukurydzy Bt. Ten ciekawy eksperyment wykazał znacznie silniejszy wpływ suszy po 4 dniach oraz wystąpienie efektu synergistycznego po 6 dniach działania czynnika biotycznego i abiotycznego.

W następnym podrozdziale Autorka przedstawiła wyniki eksperymentów laboratoryjnych z udziałem dwóch gatunków mszyc zbożowych *M. dirhodum* i *Sitobion avenae*, dotyczących wyboru badanych odmian kukurydzy i rozwoju owadów. Ku ogromnemu zaskoczeniu obydwu gatunki mszyc zdecydowanie lepiej akceptowały kukurydzę Bt niż odmianę izogeniczną i referencyjną. Nie odnotowano także znaczących różnic w czasie rozwoju larw na badanych kukurydzach, natomiast wystąpiły wyraźne różnice w wartości badanych parametrów bionomicznych i populacyjnych. Tak więc druga hipoteza badawcza została zweryfikowana negatywnie. Autorka uzasadnia to m.in. odmienną strukturą powierzchni liści badanych kukurydzy, uwidocznioną w obrazie elektronowego mikroskopu skaningowego, jak również różnicami w zawartości wolnego azotu i związków fenolowych. Zdaniem Recenzenta ten obraz jest niepełny ponieważ nie określono w badanych odmianach zawartości cyklicznych kwasów hydroksamowych, które są powszechnie uznawane za ważne czynniki różnicujące podatność zbóż na mszyce.

Wreszcie, niemal połowę objętości tego rozdziału zajmuje prezentacja wpływu żerowania mszycy różano-trawowej (floemowy szkodnik niedocelowy) oraz przędziorka chmielowca (mezofilowy szkodnik niedocelowy) na aktywność enzymatycznej obrony antyoksydacyjnej. Jednak porównanie wpływu żerowania tych dwóch stawonogów na ten parametr jest ponownie bardzo trudne, z uwagi na znaczne różnice w zakresie wykonanych badań. I tak dla mszycy określono tylko zmiany w aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) i peroksydazy (POX) pod wpływem żerowania szkodnika, w tkankach 6 i 7-ego liścia. Z kolei, dla przędziorka dodatkowo zmiany w zawartości wody i suchej masy oraz w aktywności SOD, CAT i POX, lecz z uwzględnieniem wpływu szkodnika, suszy glebowej i efektu łącznego, po 4 i 6 dniach. Reasumując, odnośnie trzeciej hipotezy badawczej, dla pojedynczych stresów biotycznych, nie wykazano znaczących różnic w aktywności badanych enzymów antyoksydacyjnych (w przypadku SOD i POX tendencje wzrostowe w obu przypadkach, a dla CAT spadek aktywności). Dla tego szkodnika nie określono jednak wpływu suszy glebowej. W przypadku łącznego wpływu przędziorka i suszy stwierdzono (po 6 dniach), że na ogół susza wywierała większy wpływ na aktywność enzymatycznych antyoksydantów. Przy czym, w przypadku łącznego ich działania, w tkankach linii transgenicznej odnotowano synergistyczny wpływ na aktywność SOD i POX oraz antagonistyczny na aktywność CAT.

Z drobnych potknięć redakcyjnych, dostrzeżonych w tym rozdziale można wymienić:

- niezachowanie standardu takiej samej liczby miejsc po przecinku w konkretnych tabelach (np. Tab. 11),
- zamiast w tkankach, używanie określeń „w osobnikach” lub „w ciałach”,

- trudne do zrozumienia stwierdzenia „...do silnego wzmocnienia jednej podjednostki POX...” lub „...skutkowało też osłabieniem podjednostek...” (str. 100),
- różne skale na rysunkach przedstawiających zmiany w aktywności SOD pod wpływem żerowania *M.dirhodum* (Rys. 24) i *T. urticae* (Rys. 33), znacznie utrudniające interpretację występujących zmian.

W rozdziale „Dyskusja” Autorka udowodniła, że doskonale porusza się w tematyce badawczej, będącej przedmiotem rozprawy oraz potrafi konfrontować wyniki badań własnych z danymi literaturowymi. W tej obszernej części pracy, obejmującej 26 stron, Doktorantka wyczerpująco odniosła się do wszystkich aspektów będących przedmiotem rozprawy. Aczkolwiek Recenzent ma wątpliwości czy przedziorka chmielowca można już uważać za gatunek wskaźnikowy na kukurydzy. Jeszcze raz chciałbym także zauważyć, że na określone parametry populacyjne istotny wpływ mogły wywierać niebadane w tej pracy cykliczne kwasy hydroksamowe. Chciałbym także zwrócić uwagę Doktorantce, że podczas pisania prac naukowych należy używać czasu przeszłego, dokonanego oraz formy bezosobowej.

Pracę kończy 8 wniosków, zdaniem Recenzenta dobrze oddających najważniejsze stwierdzenia wynikające z przeprowadzonych badań.

Wniosek końcowy

Przedstawione uwagi nie podważają wysokiej wartości merytorycznej, niezwykle kompleksowej rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Dworak, którą oceniam bardzo wysoko. Mają jedynie na celu pomóc Doktorantce, w Jej dalszej pracy naukowej, która na podstawie lektury przedłożonej rozprawy wydaje się rokować znakomicie. Stwierdzam, że oceniana praca spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim, w ustawie o tytule naukowym i stopniach naukowych i z pełnym przekonaniem wnioskuję do Rady Wydziału Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego o dopuszczenie mgr inż. Anny Dworak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Siedlce, 1 czerwca 2016

Prof. dr hab. Bogumił Leszczyński