

Dr hab. inż. Paweł K. Bereś, prof. nadzw. IOR-PIB  
Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy  
Terenowa Stacja Doświadczalna w Rzeszowie

Rzeszów, 26.08.2016

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Eweliny Żmijewskiej

### **Analiza zawartości białka Cry1Ab w kukurydzy MON810 i jego rozpadu w środowisku, jako element badań nad bezpieczeństwem GMO**

przygotowanej w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowym Instytucie Badawczym, Zakładzie Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin, Laboratorium Kontroli Genetycznie Zmodyfikowanych Organizmów

(Promotor – Prof. dr hab. Janusz Żimny; promotor pomocniczy – dr inż. Anna Linkiewicz)

#### **1. Wprowadzenie**

Bakteria *Bacillus thuringiensis* to bardzo ważny mikroorganizm wykorzystywany w ochronie roślin przed szkodnikami na całym świecie. Została po raz pierwszy wyizolowana w 1901 roku w Japonii i od tego momentu rozpoczęła się jej kariera jako podstawowego elementu składowego biopestycydów aplikowanych w formie nalistnej. Zastosowanie jednak takich preparatów nie zawsze przynosiło pożądane efekty owadobójcze m.in. z powodu nierównomiernego nanoszenia cieczy roboczej na rośliny, konieczności wykonywania kilku zabiegów ochronnych, niechronieniu przez białka Cry nowo wytworzonych komórek roślinnych czy też niestabilności wytwarzanych przez bakterię białek na promieniowanie UV i wpływ zmiennych warunków pogodowych. Te problemy rozwiązała inżynieria genetyczna. Dała ona początek istnieniu tzw. transgenicznej kukurydzy, która sama wytwarzała bakteryjne białko toksyczne dla szkodników w ciągu całego okresu wegetacji roślin, a które było obecne we wszystkich komórkach i niewrażliwe lub mało wrażliwe na oddziaływanie czynników zewnętrznych np. promieniowanie słoneczne.

Kukurydza transgeniczna linii MON 810 będąca obiektem rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Żmijewskiej to doskonały przykład praktycznego użycia w ochronie roślin bakterii *Bacillus thuringiensis* spp. *kurstaki* odpowiedzialnej za wytwarzanie białka Cry1Ab o działaniu owadobójczym na szkodniki z rzędu motyli (Lepidoptera), a w szczególności na omacnicę prosowiankę (*Ostrinia nubilalis* Hbn.).

Kukurydza zmodyfikowana genetycznie, w tym z genem odporności na omacnicę prosowiankę jest obiektem licznych sporów pomiędzy zwolennikami oraz przeciwnikami roślin GMO w kontekście jej bezpieczeństwa dla człowieka, zwierząt, jak również środowiska. Jednym z poruszanych zagadnień w trakcie dyskusji stron „konfliktu” jest obawa o możliwość kumulacji (wzorem pestycydów chemicznych) toksycznego białka Cry w środowisku (np. w glebie), co może stanowić zagrożenie np. dla organizmów niedocelowych. Praca doktorska Pani mgr Eweliny Żmijewskiej jest próbą udzielenia odpowiedzi na ten bardzo wrażliwy temat.

## **2. Ogólna ocena rozprawy**

Przedstawiona do recenzji praca liczy 121 ponumerowanych stron oprawionego, jednostronnego wydruku komputerowego. Numeracja pracy rozpoczyna się od rozdziału „Wstęp i cel pracy” a kończy na „Aneksie”. Rozdział „Wstęp i cel pracy” dodatkowo poprzedzają nienumerowane karty zawierające: stronę tytułową, stronę z podziękowaniami, stronę z oświadczeniem promotora i autora rozprawy, streszczenie w języku polskim (2 strony), abstrakt w języku angielskim (2 strony), spis treści (3 strony), spis rysunków (2 strony) oraz spis tabel (2 strony). Należy zatem uznać, że cała praca liczy 135 stron. Tekst główny pracy liczy 106 stron.

Pomimo, że numeracja stron pracy następuje od rozdziału „Wstęp i cel pracy”, to numeracja rozdziałów rozpoczyna się od „Przeglądu literatury” (rozdz. 1). Autorka wydzieliła w pracy 5 rozdziałów: „Przegląd literatury” (rozdz. 1), „Materiał i metody” (rozdz. 2), „Wyniki” (rozdz. 3), „Dyskusja” (rozdz. 4) i „Wnioski” (rozdz. 5). W ramach tych rozdziałów Autorka dodatkowo zastosowała podział na: podrozdziały, podpodrozdziały, a w kilku miejscach na podpodpodrozdziały. Pozycje bibliograficzne zajmują 14 stron. Autorka dodatkowo wydzieliła „Aneks” (1 strona).

Układ pracy nieco odbiega od ogólnie stosowanych w rozprawach doktorskich, gdzie po stronie tytułowej następują następujące elementy: spis treści; wprowadzenie (wstęp); rozdziały i podrozdziały z których każdy posiada numer i tytuł (w tym rozdział materiał i metody, wyniki, dyskusja); podsumowanie i wnioski; bibliografię; wykaz załączników wraz ze spisem ich zawartości (np. spis tabel i rysunków); tytuł i streszczenie w języku polskim oraz jako ostatnie tytuł i streszczenie w języku angielskim. Przyjęcie takiego podziału poprawiłoby czytelność pracy, niemniej obecny układ nie wpływa na pogorszenie walorów rozprawy.

Cała praca napisana jest poprawnym językiem. Zawiera bogaty materiał dokumentacyjny w postaci przejrzystych rysunków i tabel (30 rysunków numerowanymi od 1 do 18, w przypadku niektórych zastosowano dodatkowy podział na rysunek „a” i „b” oraz z 18 tabel), które ubogacają tekst i uzupełniają słowo pisane. Jedyna uwaga w odniesieniu do niektórych tabel (nr 5, 6, 7 i 8) to nadmierna liczba linii siatki w dwóch pierwszych kolumnach, które utrudniają ich czytelność – linie te warto byłoby ukryć za pomocą odpowiedniej funkcji w programie komputerowym przy przygotowaniu wyników z wykonanych badań do stworzenia publikacji naukowej.

## **3. Uwagi szczegółowe do poszczególnych rozdziałów**

We „Wstępie i celu pracy” Doktorantka krótko wskazuje na znaczenie gospodarcze kukurydzy na świecie, w tym w Polsce w postaci dużego i stale rosnącego areału jej uprawy. Wskazuje także, że szkodniki mogą powodować straty w plonach dochodzące do 20, a nawet 30%, a jednym z najgroźniejszych jest omacnica prosowianka. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że kukurydza linii MON 810 wytwarzająca białko Cry1Ab to odpowiedź człowieka na szkodliwość tego owada, czuje się niedosyt, że Doktorantka nie rozwinęła problemu tego szkodnika na świecie, w tym w Polsce wskazując jakie bezpośrednie i pośrednie straty w plonach powoduje, co z kolei było przesłanką do tego, że kukurydza GMO w ogóle dotarła na kontynent europejski i do Polski. Dodatkowo Autorka bazowała na nieaktualnych danych wskazujących na występowanie tego gatunku w 12 województwach w Polsce, podczas, gdy od 2009 roku owad zasiedla cały kraj i są dostępne stosowne publikacje na ten temat. Wskazać także należy, że omacnica prosowianka została kilka lat temu zaklasyfikowana do rodziny wachlarzykowate (Crambidae). We „Wstępie” doktorantka wskazuje także na możliwość

ograniczania liczebności i szkodliwości omacnicy prosowianki za pomocą kukurydzy linii MON 810 wytwarzającej białko Cry1Ab. Przytacza areał uprawy roślin GM na świecie, niemniej warto byłoby także w tej części pracy wskazać jaki areał uprawy kukurydzy transgenicznej miał miejsce w Polsce zanim zakazano uprawy tego typu roślin. Areał ten wynosił ok. 3 tys. ha. Ważnym zagadnieniem poruszonym syntetycznie w tej części pracy przez Doktorantkę jest bezpieczeństwo stosowania GMO – konieczność monitorowania środowiska pod kątem możliwych negatywnych konsekwencji uprawy tego typu roślin. Mgr Ewelina Żmijewska we „Wstępie” prezentuje hipotezy badawcze jakie chce rozwiązać. Ich weryfikacja nie byłaby możliwa bez oceny metod używanych do oznaczania białka Cry1Ab w roślinach oraz walidacji metody jego oznaczania w glebie. Jest to pierwsza i jedyna tego typu praca badawcza w Polsce, a więc pionierska, co zasługuje na szczególne wyróżnienie.

„Przegląd literatury” to bardzo rozbudowany rozdział w przedkładanej do recenzji pracy liczący 34 strony, podparty najważniejszymi publikacjami dotyczącymi tematu, które Doktorantka trafnie dobrała. Autorka podzieliła go na 7 podrozdziałów dzięki czemu całość jest czytelniejsza, tym bardziej, że w tej części pracy mgr Ewelina Żmijewska pokusiła się o przedstawienie bardzo szerokiej problematyki związanej z roślinami GM. W poszczególnych podrozdziałach Autorka omawia: (1) jak wygląda ocena ryzyka stosowania GMO w środowisku w oparciu o obowiązujące akty prawne w Unii Europejskiej; (2) opisuje monitorowanie środowiska po wprowadzeniu do obrotu GMO również w oparciu o obowiązujące w UE akty prawne; (3) przedstawia opis białka Cry1Ab oraz (4) kukurydzy linii MON 810 m.in. w kontekście wpływu wybranych czynników na zawartości białka Cry1Ab. Kolejne podrozdziały (5, 6 i 7) to już bardzo szczegółowy opis związany z analityką obecności białka bakteryjnego w roślinach i glebie. Część jednak z poruszanych tu kwestii jak np. oznaczanie białka Cry, czy też czynniki wpływające na jego rozpad powinny być przeniesione do rozdziału z dyskusją wyników. W przyjętej przez Doktorantkę strukturze rozdziału „Przegląd literatury” zasadne byłoby dokonanie pewnych przesunięć podrozdziałów, co uczyniłoby całość bardziej logiczną – wpiętych zatem należałoby omówić co to jest za bakteria *Bacillus thuringiensis* (od kiedy jest stosowana, jakie ma właściwości, dlaczego jest tak ważna w ochronie roślin, opis białka Cry1Ab itp.), następnie przejść do omówienia kukurydzy MON 810 z uzasadnieniem dlaczego w ogóle powstała taka linia (a tego w przeglądzie literatury brakuje – nie wspomina się o dużej szkodliwości omacnicy prosowianki w USA, które dało impuls do stworzenia kukurydzy odpornej na żerowanie tego owada, brakuje także informacji o sytuacji tego szkodnika w Polsce – a jego znaczenie gospodarcze z roku na rok wzrasta itp.). W tym podrozdziale można byłoby krótko omówić także efektywność zwalczania *O. nubilalis* z wykorzystaniem odmian kukurydzy linii MON 810, zwłaszcza, że literatura jest bogata w takie wyniki badań. Dopiero po tych wprowadzeniach zasadne byłoby już odniesienie się do aspektów bezpieczeństwa roślin GM dla środowiska oraz stricte już analityki nad zawartością białka Cry1Ab.

Rozdział „Materiał i metody” został bardzo dokładnie opisany na 11 stronach i podzielony na trzy podrozdziały, a te z kolei na kolejne podpodrozdziały. Dzięki takiemu układowi czytelnik doskonale orientuje się jakie badania krok po kroku zostały przeprowadzone, a to jest niezmiernie ważne, przy tego typu pracy analitycznej, zwłaszcza, że Doktorantka wykonała wiele analiz laboratoryjnych. Mgr Ewelina Żmijewska dokładnie omawia w poszczególnych podpunktach m.in. w jakich latach i lokalizacjach prowadziła doświadczenia, jak wyglądał układ poletek, na jakim materiale zebrany z pola pracowała (odmiana kukurydzy Bt – DKC 3421YG, odmiana izogeniczna – DKC 3420, odmiany referencyjne – Bosman i Wigo, jakie części roślin analizowała - korzenie, łodygi, liście, pyłek, ziarno; gleba z różnych głębokości, gleba

z pól po wieloletniej uprawie kukurydzy GM i po kukurydzy nonBt itd.). Wskazuje jaki materiał zastosowała w testach laboratoryjnych (m.in. białka Cry1Ab od różnych producentów potrzebne do walidacji metody oznaczania ich w glebie i standaryzacji testu ELISA, biopestycyd Dipel WG, liście kukurydzy MON 810 odmiany DKC 3421YG, zestawy do analiz jakościowych do testu ELISA: QualiPlate Kit for Cry1Ab/Cry1Ac oraz Agdia-Bt-Cry1Ab/1Ac itd.). W kolejnych podrozdziałach Doktorantka omawia jakich metod użyła do standaryzacji testu ELISA, oznaczania białka Cry1Ab w tkankach roślinnych i glebie, oznaczenia stężenia azotu ogólnego w liściach, walidacji metody oznaczania białka Cry1Ab (m.in. ustalenia decyzyjnej wartości granicznej, zdolności wykrywania, odzysku białka), czy też określenia tempa rozpadu białka Cry w warunkach kontrolowanych w glebie niewyjałowionej i wyjałowionej. Rozdział zamyka informacja o zastosowanych metodach statystycznych. Wskazać należy, że zastosowane przez Doktorantkę narzędzia badawcze i weryfikacyjne zostały bardzo dobrze dobrane i w pełni pozwoliły zrealizować cel badania. Pewna nieścisłość pojawia się w odniesieniu do lokalizacji z których pobierano materiał roślinny – w rozdziale „Materiał i metody” pojawia się nazwa miejscowości Dębówka, podczas, gdy w dalszych częściach pracy mówi się o miejscowości Szymanów – zapewne to pomyłka redakcyjna.

Rozdział „Wyniki” obejmuje 35 stron tekstu, w który umiejętnie wpleciono niezmiernie potrzebne rysunki oraz tabele. Rozdział ten został podzielony na sześć podrozdziałów, w których Doktorantka szczegółowo omawia uzyskane wyniki badań dotyczące: standaryzacji testu ELISA, analizy zawartości białka Cry1Ab w kukurydzy MON 810, analizy zawartości azotu ogólnego w liściach kukurydzy GM, walidacji metody oznaczania białka Cry1Ab w glebie, analizy tempa rozpadu tego białka w glebie w warunkach laboratoryjnych oraz określenia stężenia tegoż białka w glebie na polu, na którym przez kilka lat uprawiano kukurydzę transgeniczną. Znaczenie tego rozdziału omówione zostanie w dalszej części recenzji.

„Dyskusja” łącznie obejmuje 22 strony maszynopisu. Rozdział ten został podzielony na 6 podrozdziałów, w których Doktorantka odnosi się do problematyki badawczej tj. oceny ryzyka i monitorowania roślin GM po wprowadzeniu do obrotu, oznaczenia stężenia białka Cry1Ab (w tym w tkankach roślin i glebie), obecności białka Cry w glebie oraz czynników wpływających na jego trwanie. Jak już wspomniano wiele elementów jakie Doktorantka zawarła w przeglądzie literatury z powodzeniem mogło zostać przeniesione właśnie do „Dyskusji”, tym bardziej, że część poruszanych kwestii jest powielana w obu rozdziałach.

Rozdział „Wnioski” zajmuje 1 stronę maszynopisu. Uzyskane rezultaty badań Doktorantka zaprezentowała w postaci 6 punktów.

Bibliografia (w łącznej liczbie 202. pozycji głównie w języku angielskim z dodatkowym podziałem na akty prawne i źródła internetowe) zajmuje 14 stron. W kilku przypadkach Doktorantka cytując daną pracę nie uwzględniła jej w późniejszym spisie literatury (np. Protokół z Kartagenu 2000 – s. 4; Crespo 2007 – s. 23; Schwarzenbach i in. 1995 – s. 28; Hopkins i Gregorich 2005 – s. 30; Mueting i in. 2013 – s. 85; Thompson i in. 1976 – s. 92) bądź też na odwrót – pozycja jest w spisie a nie jest zacytowana w tekście (np. Zhou i in. 2011 – pozycja 183). Niewielkie nieścisłości wynikały także z tego, że w tekście pracy cytowano np. pojedynczego lub dwóch autorów podczas, gdy w spisie literatury okazywało się, że było ich więcej (przykład: Jurat- Fuentes 2006 – s. 16 a powinno być Jurat- Fuentes i Adang 2006; Abel i Adamczyk 2004 – s. 21 i kilka innych stron a ma być: Abel i in. 2004; Flores 2005 – s. 28 a ma być: Flores i in. 2005). W kilku przypadkach obok cytowanego w tekście autora/ów zabrakło roku wydania pracy. Wymienione nieścisłości bibliograficzne nie wpływają jednak na

pogorszenie jakości pracy, niemniej będą Doktorantce potrzebne przy przygotowaniu ewentualnej publikacji naukowej z wykonanych doświadczeń.

Całość rozprawy doktorskiej zamyka jednostronicowy „Aneks” zawierający tylko jedną tabelę (nr 18) z opisem warunków meteorologicznych. Utworzenie aneksu w tym przypadku było niepotrzebne, gdyż tabelę można umieścić było albo w rozdziale „Materiał i metody” albo w „Wynikach”.

#### **4. Podsumowanie**

W przedkładanej do recenzji pracy Doktorantka podjęła się realizacji bardzo ważnych zagadnień związanych z kukurydzą MON 810, które miały zweryfikować dwie hipotezy badawcze: (1) warunki środowiska wpływają na zawartość białka Cry1Ab w kukurydzy MON180 oraz (2) białko Cry1Ab akumuluje się w glebie wskutek wieloletniej uprawy kukurydzy MON 810 w monokulturze.

Aby dokonać tego zadania, Doktorantka musiała w pierwszej kolejności wykonać znużającą pracę laboratoryjno-przygotowawczą (m.in. standaryzację testu ELISA, ocenę stosowanych metod oznaczania białka Cry1Ab w roślinach, walidację metody oznaczania białka Cry w glebie itd.) bez której nie można było kontynuować dalszych doświadczeń, w tym nad:

- określeniem zawartości białka Cry1Ab w korzeniach, łodydze, ziarnie, liściach i pyłku w różnych fazach rozwojowych kukurydzy Bt;
- określeniem zawartości azotu ogólnego w liściach kukurydzy odmiany Bt;
- określeniem stężenia białka Cry1Ab w glebie na stanowisku na którym uprawiana była przez kilka lat odmiana kukurydzy linii MON 810;
- ustaleniem czasu i dynamiki rozpadu białka Cry1Ab w glebie (na dwóch głębokościach profilu glebowego, w glebie wyjąłowanej i niewyjąłowanej) oraz określenia czynników determinujących ten proces w warunkach kontrolowanych.

Z przeprowadzonych przez Doktorantkę badań wysuwa się kilka wniosków praktycznych ważnych zarówno dla specjalistów zajmujących się stricte analizami laboratoryjnymi białka Cry1Ab w materiale roślinnym i glebie, a także dla osób zajmujących się bądź interesujących problematyką bezpieczeństwa kukurydzy GMO uprawianej w warunkach polowych.

Za szczególnie ważny wniosek z wykonanych badań, częściowo rozwiewający liczne wątpliwości uznaję wykazanie przez Doktorantkę, że białko Cry1Ab nie akumuluje się w glebie nawet w wyniku kilkuletniej uprawy kukurydzy Bt na tym samym stanowisku. Ten wniosek obala zatem rozpowszechniany przez niektóre środowiska acz niezawierający dotąd pogląd, że stanowiska po uprawie kukurydzy GMO są niejako „skażone” toksycznym białkiem Cry, które może długo zalegać w glebie stanowiąc zagrożenie dla środowiska.

Bezpośrednio z tą tematyką wiąże się kolejne zagadnienie jakim jest rozpad białka Cry1Ab w glebie. Doktorantka prześledziła to zjawisko w warunkach kontrolowanych i zaobserwowała, że mikroorganizmy zasiedlające glebę, niższe pH gleby (pH 5) oraz wyższa temperatura (15°C) przyspieszają degradację białka Cry1Ab. Doktorantka za pomocą modelu shift-log zaprezentowała jak wygląda dynamika rozpadu białka Cry1Ab. W odniesieniu do białka bakteryjnego pochodzenia roślinnego (z kukurydzy MON 810) zaobserwowała jego dwufazowy rozpad, w pierwszej fazie bardzo intensywny do 10 dnia obserwacji, a następnie ulegający spowolnieniu w kolejnych dniach obserwacji.

Dla praktyków bardzo ważny jest także wniosek mówiący o zróżnicowanym stężeniu białka Cry1Ab w różnych fazach rozwojowych kukurydzy w różnych częściach

roślin tj. korzeniach, łodygach, liściach, ziarnie oraz pyłku. Patrząc na to zagadnienie pod kątem entomologicznym, a więc związanym z oceną skuteczności zwalczania omacnicy prosowianki za pomocą kukurydzy MON 810 bardzo ważna jest informacja, że największe stężenie białka Cry1Ab było w liściach, a najniższe w ziarnie i pyłku. Liście to ta część roślin, która jest wprawdzie uszkodzana przez wylęgające się gąsienice, a więc w przypadku kukurydzy Bt to one początkowo odgrywają największą rolę w zwalczaniu szkodnika. Na większą koncentrację białka Cry1Ab w liściach, a tym samym ich większą toksyczność dla szkodników może również wpływać stężenie azotu ogólnego - Doktorantka wykazała tu korelację pomiędzy stężeniem azotu ogólnego a zawartością białka Cry1Ab. W tym miejscu jednak chciałbym zadać Doktorantce pytanie - czy nie zasadnym byłoby w okresie pełni wegetacji kukurydzy włączenie do analiz nad stężeniem białka Cry także i liści okołokolbowych, a więc liści o dużej powierzchni asymilacyjnej?

Dla specjalistów zajmujących się monitorowaniem czy też kontrolowaniem obecności białka Cry1Ab w tkankach kukurydzy i glebie bardzo ważne jest przede wszystkim zwalidowanie przez Doktorantkę metody oznaczania białka Cry1Ab w glebie i ustaleniu decyzyjnej wartości granicznej, zdolności wykrywania oraz określenie odzysku białka pochodzenia roślinnego i bakteryjnego.

Ważnym rezultatem badań Doktorantki (zwłaszcza dla specjalistów od analityki GMO) przy standaryzacji testu ELISA jest wykazanie, że wpływ na wynik oznaczania białka Cry1Ab mają użyte przeciwciała i bakteryjne białko Cry. Autorka wskazuje, że zastosowany przez nią zestaw QualiPlate Kit for Cry1Ab/Cry1Ac firmy Envirologix w połączeniu ze standardem białkowym z firmy Agdia Inc. jest bardziej przydatny w oznaczeniach w porównaniu do standardu z firmy Fitzgerald Int.

## 5. *Opinia końcowa*

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Eweliny Żmijewskiej pt. **„Analiza zawartości białka Cry1Ab w kukurydzy MON810 i jego rozpadu w środowisku, jako element badań nad bezpieczeństwem GMO”** jest wartościowym opracowaniem wnoszącym wiele cennych i nowych informacji w tematyce oceny bezpieczeństwa stosowania czy też monitorowania upraw kukurydzy zmodyfikowanej genetycznie, w tym przypadku linii MON 810. Jak już wspomniałem na początku niniejszej opinii - badania wykonane przez mgr Ewelinę Żmijewską są nowatorskimi w skali kraju, w związku czym zasadnym byłoby, aby zostały jak najszybciej opublikowane. Nie dostrzegłem błędów merytorycznych, a także większych błędów redakcyjnych w opiniowanej pracy poza tymi jakie zaznaczyłem, a które w żaden sposób nie umniejszają wysokim walorom merytorycznym pracy.

Na podstawie powyższego zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowego Instytutu Badawczego z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Żmijewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. inż. Paweł K. Bereś, prof. nadzw. IOR-PIB