

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt.: „Analiza zawartości białka Cry1Ab w kukurydzy MON810 i jego rozpadu w środowisku, jako element badań nad bezpieczeństwem stosowania GMO” wykonanej przez mgr Ewelinę Żmijewską w Zakładzie Biotechnologii i Cytogenetyki Roslin Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roslin – Państwowego Instytutu Badawczego w Radzikowie.

1. Wprowadzenie

Wzrastająca liczba ludności na ziemi oraz podniesienie poziomu życia w wielu krajach stanowi wyzwanie dla głównego producenta żywności jakim jest rolnictwo. Osiągnięty w ostatnich dziesięcioleciach wzrost produkowanej żywności uzyskano za sprawą szeregu dyscyplin naukowych: genetyki, hodowli, nawożenia i ochrony przed agrofagami. Niektóre z tych osiągnięć uzyskano kosztem środowiska naturalnego, jednym z nich jest nadmierna chemizacja produkcji rolnej stąd wprowadzane zarówno na poziomie krajowym jak i unijnym ograniczenia w stosowaniu nawozów i pestycydów. W działaniach zapewnienia bezpiecznej żywności od lat aktywne są organizacje konsumenckie a ostatni czynnie do zapewnienia tego bezpieczeństwa włączyły się sieci supermarketów stawiające warunek stosowania 3, a najwyżej 4 pestycydów w trakcie uprawy i przechowywania płodów rolnych. Główną obawą w tej decyzji nie jest nawet poziom pozostałości pestycydów gdyż ten jest badany i nie może być przekroczony, natomiast praktycznie nie badane jest działanie synergistyczne między stosowanymi pestycydami i grupami tych środków. Innymi słowy na obecnym etapie w ochronie roślin przed agrofagami obok zawsze ważnego zdrowia konsumentów równie istotny stał się wpływ na środowisko. W trakcie sezonu wegetacyjnego i podczas uprawy środowisko glebowe ulega wielu zmianom, dla zachowania "zdrowia" gleby, szereg krajów przyjęło zasadę (jako pierwsi Niemcy), którą zdefiniowano następująco: „Gleba na początku sezonu wegetacyjnego musi być w takim samym stanie jak na początku sezonu w roku ubiegłym”. Przedstawiona do recenzji rozprawa wpisuje się w działania przestrzegania tej definicji.

2. Dane formalne o rozprawie

Praca liczy 121 stron, część graficzna zawiera 18 rycin, łącznie z aneksem 18 tabel które pozwalają na precyzyjne przeprowadzenie analiz i udokumentowanie stawianych hipotez. Wprawdzie dla wykresów graficznych, które wykonuje się techniką grafiki komputerowej preferuję się raczej określenie rycina, zamiast przyjętego przez Autorkę

oznaczenie rysunek, nie jest to błędem a raczej zachowanie pewnej poprawności..

Bibliografia rozprawy liczy 184 pozycje literatury anglojęzycznej oraz 3 pozycje w języku polskim, stanowiąc razem 187 pozycji. Autorka zamieszcza również informacje źródłowe o 7 aktach prawnych na które się powołuje w rozprawie a w tematyce tej pracy pełni one istotną rolę. Zamieszcza również informacje o 8 źródłach internetowych. Sam układ rozprawy jest typowy dla opracowań z tego obszaru nauki. Objętości najważniejszych rozdziałów rozprawy wynoszą odpowiednio: streszczenie polskie i angielskie 4 str., spis treści oraz tabel i rysunków zajmuje 7 str., wstęp oraz cel pracy 2 str., przegląd literatury zajmuje 34 str., materiały i metody zajmują 11 str., wyniki 34 str., dyskusja 21 str. oraz wnioski zawarte na 1 stronie. W przeglądzie zgromadzonej literatury uwagę zwraca dobrze przedstawiona sytuacja prawna użytkowania genetycznie zmodyfikowanych organizmów

3. Dane merytoryczne o rozprawie

Podjęte w rozprawie doktorskiej zagadnienia stanowią część prowadzonych od czasu powołania badań w Pracowni Kontroli Genetycznie Modyfikowanych Organizmów (GMO), wchodzącej w skład Zakładu Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin, Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Radzikowie. Rozprawa dotyczy obszaru nauki ściśle związanego z zadaniami jakie statutowo wypełnia Pracownia Kontroli Genetycznie Modyfikowanych Organizmów. Zasadniczym nurtem badawczym przedstawionej do oceny rozprawy było sprawdzenie dwóch hipotez. Pierwszej jak warunki środowiskowe wpływają na zawartość białka Cry1Ab w kukurydzy MON810 uprawianej w Polsce. Zmodyfikowaną kukurydzę jej linie isogeniczne oraz odmiany referencyjne dla tego celu uprawiano w trzech różnych miejscach w kraju. Poziom białka Cry1Ab oznaczano w różnych organach rośliny w wybranych stadiach rozwojowych oraz w pyłku i nasionach. Druga hipoteza miała dać odpowiedź czy białko Cry1Ab akumuluje się w glebie w wyniku wieloletniej uprawy genetycznie zmodyfikowanej kukurydzy zarówno kiedy podawane jest jako bakteryjne w warunkach polowych w formie oprysku oraz syntetyzowane w roślinie i dostające się do gleby z rozkładających się korzeni i masy roślinnej pozostawianej na powierzchni gleby po zbiorze ziarna.

4. Ocena rozprawy

Problematyka podjęta w rozprawie wychodzi naprzeciw powszechnie prezentowanemu zapotrzebowaniu społecznemu na pomoc i rozwiązanie przez naukę problemów nie przewidzianych czasami kiedy opracowana technologia jest wdrażana na dużą

skale. Społeczeństwo coraz częściej stawia pytania o stan środowiska i bywają one coraz bardziej stanowcze gdyż dorosłe staje się pierwsze pokolenie, które od przedszkola było edukowane treściami dbałości o środowisko. Celem przedstawionej do recenzji rozprawy było przygotowanie odpowiedzi na ile uprawa genetycznie zmodyfikowanej kukurydzy odpornej na omacnicę prosowiankę stwarza ryzyko zmian w środowisku zagrażających jego funkcjonowaniu.

Tytuł rozprawy jest wyrazowo dłuższy ale bardzo trafnie oddaje jej treść. Wstęp rozprawy przedstawia nam znaczenie gospodarcze kukurydzy, której powierzchnia uprawy w Polsce osiągnęła 1,2 mln ha oraz kreśli obraz zagrożenia ze strony głównego naszych warunkach szkodnika tej rośliny. W tej części rozprawy przedstawiona została historia wprowadzenia genetycznej modyfikacji oraz obecny stan zasiewów genetycznie zmodyfikowanych odmian tego gatunku w skali światowej. W końcowej części przedstawiono dwie hipotezy badawcze, które postanowiono sprawdzić zarówno w warunkach laboratoryjnych i polowych.

Następny rozdział stanowi przegląd literatury w pierwszej jego części Autorka przedstawia zasady oceny ryzyka stosowania GMO w środowisku zaznaczając że jest to niezbędny element wprowadzenia do obrotu genetycznie zmodyfikowanych roślin. Przytacza zarówno Protokoły i Konwencje obowiązujące sygnatariuszy (po podpisaniu) w skali światowej oraz Dyrektywy i Rozporządzenia Unii Europejskiej i Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności w pełni obowiązujące Polskę jako członka UE. Zawarte w tych aktach prawnych obowiązki i zasady monitorowania środowiska po wprowadzeniu GMO do środowiska dotyczą zarówno ogólnego nadzoru jak i monitorowania konkretnego przypadku. Na podstawie zawartych w tych dokumentach zasad postępowania Autorka rozprawy proponuje własny schemat postępowania w ocenie ryzyka uprawy roślin GM, spełniający wymagania zawarte w tych aktach. Proponowany schemat oceny ryzyka oparty jest na przemyśleniach i wynikach innych osób i gremiów z tego powodu umieszczony jest w przeglądzie literatury, jednak zdaniem recenzenta jego propozycja ma również pewien element twórczy. W kolejnej części przeglądu literatury doktorantka scharakteryzowała budowę, właściwości i mechanizm działania białka Cry1Ab, odmianę kukurydzy MON810 oraz jej zmienność w porównaniu do nietransgenicznych odmian izogenicznych. W badaniach białka Cry1Ab dużym wyzwaniem jest oznaczenie jego stężenia w roślinie a szczególnie w glebie gdzie ma miejsce adsorpcja przez minerały ilaste i próchnicę. Autorka przedstawiła stan badań nad rozkładem biomasy kukurydzy, trwałością białka Cry1Ab w glebie polowej i wyjałowionej, oraz wpływie na ten rozkład pH gleby i temperatury. Przedstawiany stan badań nad białkiem Cry1Ab w roślinie i

glebie przybliżyła nam i uzasadnia zastosowane przez Autorkę metody w jej badaniach. Natomiast w tej części rozprawy zabrakło mi bardziej generalnego ustosunkowania się do GMO, pokazującego zalet i wady technologii uprawy opartej na tych odmian w tym możliwych konsekwencji środowiskowych. Taki bilans może być trudny do przeprowadzenia ale powinien być dokonany aby przy dominującej w Europie niechęci do GMO nie stracić korzyści jakie może przynieść kiedy jest prawidłowo stosowana.

Rozdział materiały i metody jest dobrze opracowany. W mojej ocenie Autorka postąpiła bardzo poprawnie metodycznie dokonując w pierwszej kolejności w własnym laboratorium oceny dostępnych na rynku kitów testu ELISA, dokonała standaryzacji i konwersji wyznaczającej funkcję która posłużyła na transformacje uzyskanych wyników. Ustaliła zgodnie z wytycznymi Komisji Europejskiej decyzyjne wartości graniczne $CC\alpha$ i zdolność wykrywania ($CC\beta$), na bazie tych wyników dopracowała metodykę pomiaru poziom białka w kukurydzy i glebie, oznaczyła odzysk z gleby białka roślinnego i bakteryjnego. Natomiast inne analizy jak poziom azotu ogólnego w roślinach czy skład granulometryczny gleb wykonano zgodnie z obowiązującymi metodami. Uzyskane wyniki wspiera przeprowadzona analiza statystyczna, której znajomością wykazała się przy ich opracowaniu i interpretacji..

Rozdział wyniki prezentuje uzyskane dane w sposób bardzo czytelny za sprawą zarówno dobrze skonstruowanego podziału rozprawy, formy przedstawienia oraz ich opisu.. Pierwszy podrozdział wyników poświęcony jest standaryzacji testu ELISA. Autorka oceniła standardy białka Cry1Ab z firmy Fitzgerald International Industries i Agdia na płytkach opłaszczonych przeciwciałami z firm Agdia i Envirologix. Uzyskane wyniki były podstawą do stosowania w pomiarach białka Cry1Ab płytek firm Envirologix na których standardy wyznaczono białkiem Fitzgerald. Opracowanie metodyki pomiarów pozwoliło na analizę zawartości białka Cry1Ab w kukurydzy MON810 uprawianej w trzech lokalizacjach w trzech fazach rozwojowych: BBCH 39, 65 i 79 odpowiadających odpowiednio wykształcaniu i rozwoju organów wegetatywnych, fazy kwitnienia i rozwoju ziarniaków. W tych fazach rozwojowych w latach 2009 i 2010 oznaczano poziom białka w korzeniach, łodydze, liściu górnym i liściu dolnym oraz w pyłku i ziarnie. Nie odnotowano różnic pomiędzy lokalizacjami, natomiast odnotowano różnice pomiędzy latami z wyraźnie wyższym poziomem białka Cry1Ab w roku 2009. W najbardziej nas interesującej obecności badanego białka w różnych organach rośliny wysokie i wyraźnie statystycznie istotne jego zawartości stwierdzono w liściach. Różnice między liśćmi górnym i dolnym zwykle nie zawsze były istotne chociaż istotnych różnic był więcej na korzyść liścia górnego. Istotności omawianych

różnic jest w pracy dobrze udokumentowana. Interesującym wynikiem uzyskanym w pracy była korelacja zawartości.

białka Cry1Ab z zawartością azotu ogólnego przy czym w czterech przypadkach na 6 zawartość azotu ogólnego była wyższa u odmiany zmodyfikowanej. Kolejne przedstawione wyniki prezentują rozpad białka Cry1Ab bakteryjnego i roślinnego w warunkach kontrolowanych w glebie wyjałowionej (co pozwoliło na oddzielenie wpływu mikroorganizmów na rozkład białka) oraz nie wyjałowionej. Stwierdzona jednak rozpad (lub wiązanie?) białka również w glebie wyjałowionej co sugeruje udział innych mechanizmów w jego losach w środowisku. Dla przybliżenia badań do warunków naturalnych prowadzono je w glebie o pH 5 i 7 oraz temperaturze 4 i 15 stopni Celsjusza. Szybszy rozpad białka w temperaturze 15°C jest zrozumiałe i w praktyce nie mamy na niego wpływu, natomiast bardziej intensywny rozpad w glebie bardziej kwaśnej o pH 5 jest informacją którą możemy wykorzystać w prowadzonej technologii uprawy. Kluczowym w prowadzonych badaniach było oznaczenie stężenie białka Cry1Ab w glebie na której uprzednio uprawiano odmianę MON810 pobranej w Głuchowie i Budziszewie z dwóch głębokości, warstwy ornej 0-30 cm oraz podglebia 30-60 cm. W żadnej z badanych próbek na poziomie decyzyjnej wartości granicznej CC α nie odnotowano obecności białka Cry1Ab.

Dyskusja, jest ważnym elementem każdej rozprawy naukowej ze względu na konfrontacje uzyskanych wyników z rezultatami uzyskanymi przez innych autorów. Autorka rozprawy zgromadziła znaczną większość opublikowanej literatury z zakresu metodyki oznaczania białka Cry1A oraz jego losów w roślinach kukurydzy i środowisku stąd prowadzona dyskusja jest stosunkowo obszerna. W prowadzonej dyskusji w pełni zachowana jest poprawności metodyczna i logiczna, Autorka umiejętnie konfrontuje wyniki swoich badań z dostępnymi danymi literaturowymi. Uzyskane wyniki dotyczące poziomu białka Cry1Ab w organach kukurydzy są zgodne z wynikami większości innych autorów prowadzących podobne badania i wykazujących się działaniem ochronnym przed omacnicą prosowianką.

Końcowym opisowym rozdziałem rozprawy są wnioski, które w liczbie 6 obok wskazówek zachowania poprawności metodycznej w badaniach białka Cry1Ab i konieczności wyznaczenia parametrów walidacyjnych (decyzyjnej wartości granicznej i zdolności wykrywania, wskazują na wpływ czynników biotycznych i abiotycznych na dynamikę rozpadu tego białka. Najbardziej oczekiwany a tym samym najbardziej cennym, dający odpowiedź na postawioną hipotezę badawczą jest wniosek 5, który stwierdza nieobecność białka Cry1Ab na stanowiskach gdzie kukurydzę uprawiano 3 i 4 lata po sobie.

Należy jednak podkreślić iż niektóre z przedstawionych wniosków są sformułowane zbyt ogólnikowo np. wniosek nr 2, podanie w jakiej temperaturze i jakim pH odnotowano wzrost dynamiki rozpadu byłoby bardziej przemawiające i przydatne dla zainteresowanych.

Jak każde opracowanie, praca doktorska mgr Eweliny Żmijewskiej nie jest wolna od pewnych słabości. Ogólna uwaga dotyczy nie ustosunkowania się w przeglądzie literatury do szeroko dyskutowanej szczególnie w Europie, koncepcji obecności GMO w obecnym rolnictwie i w przyszłości. Uwaga ta nie umniejsza rozprawie po prostu ciekaw jestem opinii osoby zawodowo kompetentnej w tej dziedzinie (nie zależnie czy jest za lub przeciw GMO), w przeciwieństwie do opinii wygłaszanych przez zabiegających o sensacje dziennikarzy.

Drobna uwaga dotyczy nieścisłości na str.73 kiedy Autorka pisze o odczynie zasadowym gleby a eksperyment prowadzono w pH 5 oraz pH 7 czyli obojętnym. Pragnę podkreślić że rozpraw napisana jest starannie, z bardzo prawidłowym nazewnictwem a przy tym komunikatywnym językiem. Plusem tekstu rozprawy jest również brak typowych literowych błędów komputerowych..

5. Konkluzja

W posumowaniu rozprawę doktorską mgr Eweliny Żmijewskiej oceniam jako bardzo dobrą, jest bogato udokumentowanym zbiorem informacji o poziomach białka Cry1Ab w organach kukurydzy i glebie oraz degradacji tego białka w środowisku. Opracowanie metodyki badań łącznie z ich walidacją, zgromadzenie wyników z których wyciągnięto jasno sprecyzowanych wnioski, pozwoliło na sformułowanie w pełni satysfakcjonujących odpowiedzi na postawione hipotezy.

Uważam, że praca stanowi oryginalny dorobek naukowy doktorantki, a sposób jej wykonania oraz duża swoboda poruszania się w przedstawionej tematyce badawczej pozwalają na stwierdzenie, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa w pełni odpowiada wymaganiom ustawy o stopniach i tytule naukowym i na jej podstawie wnioskuję do Rady Naukowej, Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Radzikowie o dopuszczenie mgr Eweliny Żmijewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Podjęcie się badań w obszarze w którym w Polsce nie są one prowadzone a których celem jest uzyskanie informacji budzących duże zainteresowanie środowiska naukowego i społeczeństwa było znacznym wyzwaniem i w mojej opinii mgr Ewelina Żmijewska sprostała temu wyzwaniu. Opracowanie warsztatu badawczego i wykonanie całego kompleksu badań w tym cenionych badań polowych, upoważniają mnie do przekazu że Autorka ma swój indywidualny wkład w pogłębienie naszej wiedzy o genetycznie zmodyfikowanych roślinach i pozwala na postawienie wniosku do Szanownej Rady Naukowej o wyróżnienie rozprawy mgr Eweliny Żmijewskiej stosowną nagrodą.

Warszawa 28. 08. 2016


Prof. dr hab. Stanisław W. Gawroński