

## Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Juzoń pt. **„Reakcje roślin grochu, łubinu żółtego i bobiku na stres suszy glebowej”**

Woda jest jednym z podstawowych elementów przyrody, warunkującym życie na Ziemi, jest niezastąpiona w życiu i gospodarce człowieka. Między organizmami żywymi i ich otoczeniem zachodzi nieustanna wymiana wody. Zawartość wody w tkankach może sięgać 95%. Protoplasta zawiera od 50% (w organellach bogatych w lipidy) do 90% wody. Soczyste owoce, miękkie liście i korzenie zawierają aż 70 – 95% H<sub>2</sub>O. Nawet w pozornie suchych nasionach i zarodnikach woda stanowi od 10 do 15%. W tkankach roślinnych przepływ wody odbywa się drogami: apoplastyczną, symplastyczną i poprzez błony komórkowe z udziałem błonowych białek, akwaporyn (AQP). Obecność akwaporyn umożliwia transport wody przez błony biologiczne i zwiększa przepuszczalność cząsteczek wody nawet stukrotnie. Białka te zaangażowane są w pobieranie do 80% wody wchłanianej przez korzeń.

Jednym z najistotniejszych czynników abiotycznych, będących przyczyną stresu, jest zjawisko suszy. Skutki stresu spowodowanego niedoborem wody, destabilizują prawidłowe funkcjonowanie organizmu, gdyż w organizmach żywych, woda jest niezbędna do utrzymania procesów metabolicznych. Niedobór wody powoduje zahamowanie wzrostu i rozwoju roślin, ponieważ dochodzi do zaburzeń w transporcie cząsteczek wody, gazów (CO<sub>2</sub>, NO) i wielu związków niejonowych transportowanych przez AQP na poziomie międzykomórkowym. Susza wpływa także na proces kiełkowania nasion, które w tym okresie wymagają znacznych ilości wody (od 125 do 170% swojej masy). Z uwagi na fakt, że w ciągu sekundy przez AQP transportowanych jest około 2-3 miliardów cząsteczek wody, konsekwencje jej niedoboru dla organizmów roślinnych mogą być znaczne.

Dysertacja pani mgr inż. Katarzyny Juzoń dotyczy ważnego problemu poznania reakcji wybranych gatunków roślin z rodziny bobowatych na stres wywołany suszą glebową. Odpowiedź roślin na działanie suszy jest tematem bardzo złożonym, a tolerancja na ten stres jest wynikiem zmian odbywających się na wielu poziomach zaczynając od molekularnego, fizjologicznego, poprzez komórkowy i tkankowy a kończąc na całym organizmie. Podobnie wielowątkowym podejściem do realizowanego zagadnienia charakteryzuje się recenzowana rozprawa doktorska.

### Uwagi ogólne o pracy

Dysertację otwiera spis treści, po którym następuje „Wykaz stosowanych skrótów”, wymagający jednak uzupełnienia o akronimy używane w dalszej treści. W kolejnych rozdziałach Autorka zawarła przegląd literatury, pozwalający na wprowadzenie czytelnika w istotne problemy

związane z przedmiotem pracy, następnie charakterystykę badanego materiału roślinnego, opis zastosowanych metod badawczych oraz wyniki badań i ich dyskusję, kończąc podsumowaniem i wnioskami oraz spisem cytowanej literatury. Na końcu pracy umieszczono streszczenia w języku polskim i angielskim. Wydaje się, że trafniej byłoby umieścić streszczenia na początku rozprawy, ponieważ pozwoliłoby to już na wstępie, czytelnikowi zorientować się o tym co w pracy jest najważniejsze.

Recenzowana dysertacja została napisana bardzo starannie i poddana szczegółowej edycji, która była stosunkowo skomplikowana z uwagi na liczne tabele, ryciny i wykresy zawarte w rozprawie. Obejmuje ona 160 stron druku z czego tekst uzupełnia 47 tabel oraz 34 ryciny. W toku wywodu Autorka cytuje 250 pozycji literatury, z czego jedynie co piąta jest dostępna w języku polskim. Niestety Autorka nie ustrzegła się błędów w tytułach cytowanych czasopism czy też danych bibliograficznych (por. Hare P.D., Cress W.A., Van Staden J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Chaperones* 4: 129–138, powinno być: Hare P.D., Cress W.A., Van Staden J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment* 21: 535–553).

### **Część wprowadzająca i wyniki badań**

Autorka w rozdziale zatytułowanym „Wstęp” dokonała na osiemnastu stronach przeglądu literatury, opisu roślinnego materiału wybranego do badań (trzech gatunków z rodziny bobowatych: grochu siewnego, łubinu żółtego i bobiku) z uwzględnieniem znaczenia gospodarczego tych roślin. Omówiła także zagadnienia stresu suszy glebowej i reakcji roślin na ten czynnik.

Wartym podkreślenia jest fakt, że badania prowadzone przez Doktorantkę wiążą się ściśle z ważną kwestią, odnowy produkcji roślin bobowatych w Polsce. Rośliny należące do tej rodziny pełnią w środowisku rolę fitosanitarną i fitomelioracyjną. Ich pozytywne oddziaływanie na środowisko, dzięki zdolności do wiązania azotu atmosferycznego, jest dobrze poznane, odbywa się z udziałem bakterii, organizmów prokariotycznych (a nie organizmów eukariotycznych, jak to napisała Autorka – wydaje mi się że jest to po prostu pomyłka edytorska). Badania zespołu kierowanego przez prof. Janusza Prusińskiego pokazały, że poprzez wprowadzenie do płodozmianu roślin bobowatych możliwe jest znaczne ograniczenie stosowania nawozów sztucznych. Zagadnienie interakcji pomiędzy roślinami a mikroorganizmami ma znaczenie z punktu widzenia rolnictwa zwłaszcza ekologicznego.

Rodzina *Fabaceae* należy do roślin wrażliwych na zmienne warunki środowiskowe (temperatura, opady) i obecność patogenów. Największe zapotrzebowanie na wodę przypada na okres od momentu tworzenia pąków, poprzez proces kwitnienia aż do wykształcenia strąków dlatego też susza może istotnie ograniczać plonowanie. W reakcji roślin na powyższe warunki znaczącą rolę odgrywają mikroorganizmy glebowe. **Czy znane są Autorce przykłady badań dotyczących znaczenia mikroorganizmów glebowych na wzrost i rozwój bobowatych i ich ochronnej roli w warunkach stresu?** Na stronie 3 w zdaniu: „Bobowate przez całe dziesięciolecia wykorzystywane były w żywieniu zwierząt, głównie w celu podwyższenia koncentracji białka w paszy” Autorka użyła sformułowania „koncentracji białka”, a powinna raczej użyć zwrotu „zawartości białka”. Traktuję to jako niezgrabność językową, na którą warto zwrócić uwagę podczas pisania publikacji w języku polskim. Autorka w dalszej części przeglądu literatury opisała wybrane zagadnienia dotyczące suszy i jej skutków do jakich dochodzi w organizmach roślin podczas wegetacji. Opisała funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego w warunkach niedoboru wody, skupiając się przede wszystkim na fotoskładzie II (PSII), oraz zmiany zawartości związków chemicznych, wśród których wymieniła białka rozpuszczalne,



związki fenolowe, prolinę, poliaminy, cukry rozpuszczalne i przeciwutleniacze. Doktorantka część przeglądu literatury zatytułowanej „Białka” rozpoczyna zdaniem „Do związków obronnych zaliczamy białka szoku cieplnego (HSP – ang. *Heat Shock Proteins*).” Może lepiej byłoby zdanie to rozpocząć np. „W obronę roślin przed stresem suszy zaangażowane są m. in. białka HSP”. W powyższym fragmencie Autorka poza białkami HSP opisała również inne białka związane ze stresem niedoboru wody, takie jak białka LEA (ang. *Late Embryogenesis Abundant*) i dehydryny. Być może warto byłoby również odpowiedzieć na pytanie: **jakie inne funkcje pełnią białka HSP w roślinach oraz jakie mechanizmy na poziomie DNA uruchamiane są w reakcji roślin na stres suszy?** Bardzo proszę o komentarz. Poszczególne zagadnienia opisane w rozprawie doktorskiej omówione zostały wnikliwie z uwzględnieniem licznych odniesień do literatury. Jednym z wyjątków jest informacja zawarta na stronie 10, gdzie Doktorantka podaje: „Odporność roślin na suszę jest cechą ilościową uwarunkowaną przez wiele grup genów” jednak nie podaje źródeł tego twierdzenia. Dlatego też **proszę Doktorantkę o podanie wybranych przykładów genów ekspresowanych na skutek stresu wodnego poza podanymi powyżej.**

W pracy niektóre sformułowania wymagają przeredagowania np. „nie są to związki unikatowe dla szoku cieplnego” na np. „nie są to związki zaangażowane w reakcję na działanie wysokiej temperatury”; „liczbę cząstek cukrowych w cząsteczce” na np. „liczbę grup lub reszt cukrowych w cząsteczce”. Opisując budowę dehydryn Autorka użyła zwrotu: „Charakteryzuje je obecność wysoce konserwatywnej domeny[...]”. Biolodzy molekularni przyjmują, że domeny białkowe są konserwowane, a konserwatywne mogą być na przykład poglądy. Zdają sobie sprawę, że są to niewielkie niedociągnięcia językowe, które w żaden sposób nie wpływają na przejrzystość tekstu. Dobór zawartych informacji w przeglądzie literatury jest odpowiedni, ułożony w logicznej kolejności przez co płynnie wprowadza czytelnika w zagadnienia będące tematem rozprawy.

Następnie Doktorantka sformułowała cel badań, którym było poznanie reakcji roślin grochu, (należałoby dodać „siewnego” gdyż takie nazewnictwo jest stosowane w dalszej części pracy), łubinu żółtego i bobiku na stres suszy glebowej. Cel główny osiągnięto poprzez zrealizowanie pięciu celów pośrednich, według których ułożony został rozdział „Wyniki”. W tym momencie chciałabym podkreślić, wagę podjęty przez Autorkę badań, które poprzez poznanie biochemicznych, fizjologicznych i molekularnych reakcji roślin na suszę, dają szansę na rozwój hodowli roślin w kierunku poprawy odporności roślin, w tym bobowatych na ten czynnik.

Realizacja badań w doświadczonym zespole naukowym Zakładu Biotechnologii Instytutu Fizjologii Roślin PAN w Krakowie umożliwiła właściwe zaplanowanie przebiegu doświadczeń i opracowania ich wyników. W mojej opinii wysoką wartość przeprowadzonych badań ukazuje użycie, jako materiału doświadczalnego, trzech gatunków roślin bobowatych. Pierwsze doświadczenie przeprowadzono aż na sześciu odmianach grochu siewnego oraz sześciu odmianach łubinu żółtego. W kolejnych doświadczeniach (nr 2-4) wykorzystano w badaniach po dwie odmiany grochu siewnego i łubinu żółtego a w ostatnim doświadczeniu (nr 5) poddano eksperymentom po dwie odmiany wspomnianych wcześniej gatunków a także dwie odmiany bobiku. Dobrano odpowiednie metody badawcze, polegające m. in. na sprawdzeniu względnej zawartości wody w liściach oraz funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego uwzględniając ogólną zawartość chlorofilu metodą fotometryczną i aktywność fotosyntetyczną, dokonując pomiaru fluorescencji chlorofilu *a* przy użyciu fluorymetru. Postawione cele zrealizowano wykorzystując analizy biochemiczne do oznaczenia zawartości białek rozpuszczalnych, związków fenolowych, wolnej proliny, poliamin, cukrów rozpuszczalnych i przeciwutleniaczy w zliofilizowanym materiale roślinnym. Zabrakło mi jednak w

opisie doświadczeń omówienia procesu liofilizacji, dlatego bardzo proszę o omówienie przebiegu procesu liofilizacji materiału roślinnego. Dodatkowo proszę o komentarz na temat pozytywnych i negatywnych stron stosowania w badaniach materiału liofilizowanego. Kolejnym z zadań wykonanych przez Doktorantkę było analiza komponentów plonu (liczba strąków i nasion, sucha masa nasion, masa tysiąca nasion, wysokość roślin i sucha masa pędu) i wyliczenie indeksu wrażliwości na stres (SSI) oraz indeksu wrażliwości na suszę (DSI). Uzyskane wyniki opracowano pod względem statystycznym wykorzystując wielokrotny test Duncana i test t-Studenta. Obliczono także współczynniki korelacji liniowej Pearsona pomiędzy wybranymi parametrami.

Następnym rozdziałem recenzowanej dysertacji jest opis uzyskanych wyników, który zawarto na 94 stronach, co stanowi ponad połowę całej rozprawy. Najpierw Doktorantka opisała i porównała warunki środowiskowe, dotyczące temperatury i wilgotności powietrza oraz sumy opadów na przestrzeni trzech sezonów wegetacyjnych podczas których prowadzono eksperymenty. Zanotowała różnice w warunkach środowiskowych pomiędzy sezonami.

Następnie określono udział wybranych związków chemicznych i parametrów fizjologicznych w reakcji tolerancji na stres suszy glebowej i kształtowanie się elementów składowych plonu sześciu odmian grochu siewnego i łubinu żółtego różniących się tolerancją na suszę glebową, rosnących w warunkach optymalnego uwodnienia (70% ppw, połowej pojemności wodnej) i w warunkach suszy glebowej (25% ppw). Wykazano, że niedobór wody u badanych odmian obu gatunków bobowatych powodował obniżenie względnej zawartości wody w liściach i redukcję elementów składowych plonu, z wyjątkiem MTN (masy tysiąca nasion). W liściach łubinu żółtego w warunkach niedoboru wody, wykazano spadek zawartości chlorofilu i parametrów kinetyki chlorofilu  $a$ , chociaż niektóre parametry w 14 dniu wzrastały a u grochu siewnego obserwowano wzrost zawartości proliny. Ten etap badań pozwolił na wyselekcjonowanie dwóch odmian grochu siewnego (SZD 165 i Wenus) i dwóch odmian łubinu żółtego (Traper i Morocco) o zróżnicowanej tolerancji na stres suszy. Bardziej wrażliwe na suszę okazały się odmiany SZD 165 i Traper odpowiednio grochu i łubinu. Natomiast Wenus i Morocco to odmiany o wyższej tolerancji na niedobór wody. Ponadto wykazano, że w warunkach suszy, u badanych roślin najlepszymi wskaźnikami funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego są parametry  $F_v/F_m$  i Area.

Wybrane odmiany grochu siewnego i łubinu żółtego posłużyły do badań, których celem było wyznaczenie krytycznych faz tolerancji na stres suszy glebowej. W badaniach brano pod uwagę dwie fazy wzrostu roślin, fazę 5-6 liści i fazę zawiązywania strąków. Wykazano, że badane gatunki bobowatych silniej reagują na stres odwodnienia w fazie 5-6 liści, wówczas to obserwowano spadek zawartości białek rozpuszczalnych w liściach, a jedynie u łubinu żółtego zanotowano wzrost zawartości związków fenolowych i putrescyny. Co istotne, poddanie roślin stresowi niedoboru wody na wcześniejszym etapie rozwoju rzutowało na większy spadek wartości poszczególnych elementów składowych plonu tych roślin niż w przypadku stresu na późniejszym etapie (fazie zawiązywania strąków).

W dalszej części wyników sprawdzono jaka jest efektywność rehydratacji roślin bobowatych poddanych stresowi suszy glebowej w przywracaniu aktywności fizjologicznej. Rehydratacja spowodowała wzrost uwodnienia roślin, zawartości chlorofilu, cukrów i poliamin, roślin wcześniej poddanych stresowi suszy do poziomu obserwowanego u roślin kontrolnych. Proces ten jednak nie doprowadził do pełnej aktywności fizjologicznej u badanych gatunków. Rośliny rosnące w warunkach deficytu wody po wznowieniu podlewania charakteryzowały się mniejszą zawartością związków fenolowych (groch) oraz białek i proliny (łubin) w porównaniu do roślin kontrolnych. Stwierdzono



także uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego spowodowane suszą. Doktorantka pojęła się ustalenia zaangażowania poliamin w reakcje tolerancji roślin bobowatych na stres niedoboru wody. Zastosowanie inhibitora biosyntezy poliamin (DFMA) po rehydratacji u łubinu poddanego suszy spowodowało ograniczenie syntezy jedynie sperminy. Aplikacja DFMA w warunkach suszy wpłynęła na wzrost zawartości cukrów u grochu, a u łubinu związków fenolowych oraz spadek fenoli i cukrów odpowiednio u grochu i łubinu. Co ciekawe obecność inhibitora poliamin u grochu wpłynęła na wzrost MTN i suchej masy pędu oraz wytwarzanie większej ilości nasion, ale u łubinu zmniejszył liczbę nasion w strąku i liczbę nasion z rośliny.

W toku dalszych badań Doktorantka określiła zawartość wybranych związków chemicznych w nasionach grochu siewnego, łubinu żółtego i bobiku w warunkach suszy glebowej. Niedobór wody był przyczyną obniżenia zawartości związków przeciwutleniających i poliamin, a u grochu siewnego i bobiku wzrostu zawartości proliny w nasionach. Stwierdzono także spadek niemal wszystkich składowych plonu u wszystkich trzech badanych gatunków.

Z kolei analiza korelacji badanych parametrów fizjologicznych i biochemicznych wykazała negatywną korelację pomiędzy zawartością badanych związków chemicznych w liściach i ich zawartością w nasionach bobowatych oraz elementami składowymi plonu z wyjątkiem liczby nasion w strąku i suchej masy nasion.

#### **Dyskusja, podsumowanie i wnioski**

Dyskusja została przeprowadzona prawidłowo i tworzy logiczny wywód. Doktorantka w tej części rozprawy wyniki własnych badań zaprezentowała na tle wyników badań innych autorów. W celu przedyskutowania rezultatów oparła się na licznie cytowanej literaturze. Świadczy to o wnikliwym zapoznaniu się Autorki z tematyką zjawiska suszy glebowej i reakcji roślin na ten czynnik stresowy. Interpretacja uzyskanych wyników była trudna ze względu na fakt, że odpowiedź roślin na stres suszy glebowej jest zróżnicowana, co dotyczy także badanych gatunków roślin. Autorka w podsumowaniu podaje obserwacje wspólne i te różnicujące badane gatunki bobowatych. Wyniki badań uzyskane przez Doktorantkę i autorów innych badań dotyczących stresu w organizmach roślinnych spowodowanego deficytem wody sugerują, że istnieją zarówno wspólne mechanizmy reakcji roślin na suszę, jak i te specyficzne dla danego gatunku czy odmiany. Jest to z pewnością powodem trudności w interpretacji wyników i wyciągania właściwych wniosków. Chciałam podkreślić, że uzyskane wyniki w istotny sposób wzbogacają wiedzę na temat odpowiedzi roślin bobowatych na stres suszy glebowej a kontynuowanie tych badań jest jak najbardziej uzasadnione.

#### **Wniosek końcowy**

W celu zrealizowania postawionych celów pani Katarzyna Juzoń wykonała ogromną pracę przeprowadzając kolejne doświadczenia, żmudnego laboratoryjnego oznaczania zawartości poszczególnych związków chemicznych, kończąc na analizach statystycznych. Zdobyte umiejętności i doświadczenie będą z pewnością owocowały w przyszłości. Wszyscy zdajemy sobie sprawę z faktu, że hodowla roślin w kierunku poprawy odporności roślin na suszę jest trudna, kosztowna i czasochłonna z uwagi na złożony charakter odpowiedzi roślin na ten czynnik.

Pani Katarzyna Juzoń przedstawia się jako w pełni ukształtowany pracownik naukowy, zdolny do podejmowania trudnych problemów badawczych. Uzyskane wyniki badań stanowią wkład w wiedzę dotyczącą reakcji roślin użytkowych na stres suszy, która może być wykorzystana w praktyce. Praca przedstawiona przez mgr Katriżynę Juzoń spełnia wszystkie kryteria stawiane dysertacji doktorskiej.

Wnioskuje o dopuszczenie Pani Juzoń do dalszych etapów przewodu doktorskiego i z przekonaniem wnioskuje o wyróżnienie pracy.

dr hab. Grażyna Dąbrowska

