

Prof. dr hab. Maria Moś

Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Kalandyk

pt.: "Fizjologiczne wskaźniki tolerancji na suszę strączkowych roślin uprawnych i możliwość zwiększenia plonu w warunkach stresów środowiskowych"

Susza jest jednym z głównych czynników środowiskowych negatywnie wpływających na procesy życiowe roślin. W Polsce susza występuje od 1992 roku coraz częściej, a jest wynikiem obserwowanych w ostatnich latach zmian klimatycznych. Stres suszy jest jednym z czynników ograniczających zarówno ilość jak i jakość plonu, a tym samym w znacznym stopniu obniża dochodowość upraw.

Uprawa roślin strączkowych niesie za sobą liczne korzyści, wśród których można wymienić: wnoszenie do gleby azotu atmosferycznego, poprawę struktury gleby, zwiększenie zawartości próchnicy. Rośliny te wpływają także na uzyskanie wyższych plonów w uprawie roślin następczych.

Mimo licznych zalet wynikających z uprawy roślin strączkowych ich udział w powierzchni uprawy jest nadal niewielki (około 1% zasiewów ogółem). Jednym z czynników ograniczających uprawę roślin strączkowych jest duża zmienność plonowania w latach w znacznym stopniu uzależniona od przebiegu warunków pogodowych. Rośliny strączkowe są szczególnie wrażliwe na niedobór wody w glebie w okresie kiełkowania i wschodów oraz kwitnienia i zawiązywania strąków. Obserwowane jest jednak pewne zróżnicowanie genotypów na okresowe niedobory wody w glebie. Zróżnicowanie to daje szansę na znalezienie wskaźników odporności na suszę, które będą wykorzystane w hodowli genotypów odpornych na ten stres abiotyczny. Pozwolą jednocześnie na wykonanie selekcji we wczesnych fazach rozwojowych roślin, a tym samym na przyspieszenie hodowli w tym kierunku.

Tolerancja na stres suszy jest wynikiem zmian występujących na wszystkich poziomach organizacji rośliny: molekularnym, komórkowym, tkankowym oraz całego organizmu. Stąd podjęty przez Doktorantkę trudny, bardzo ambitny temat wydaje się być bardzo aktualny i mogący znaleźć zastosowanie w programach hodowlanych roślin strączkowych.

Praca jest bardzo obszerna, obejmuje 238 stron. Cytowanych jest aż 378 pozycji piśmiennictwa, w tym ponad 80% w języku angielskim. Od strony formalno metodycznej dysertacja jest poprawnie zredagowana, zawiera wszystkie rozdziały występujące w tego typu pracach. Treść pracy jest zgodna z tytułem, a rozdziały z nagłówkami. Wyniki zostały bardzo dobrze udokumentowane i opracowane statystycznie, przedstawione w 79 tabelach i na 42 rycinach. Stosowana terminologia jest poprawna i nie budzi wątpliwości.

We wstępie Autorka uzasadnia konieczność podjęcia badań nad stresem suszy u roślin strączkowych. Zwraca również uwagę na możliwość wykorzystania tej grupy roślin w rolnictwie ekologicznym.

W przeglądzie literatury przedstawia znaczenie roślin strączkowych w przyrodzie i gospodarce. Następnie skupia się na charakterystyce badanych gatunków i odmian. W dalszej części tego rozdziału przedstawia zmiany fizjologiczne u roślin powodowane stresem suszy oraz mechanizmy obronne wytworzone przez rośliny, które jednak mogą prowadzić do obniżenia plonu. Zwróciła również uwagę na złożoność mechanizmów odpowiedzi rośliny na stres suszy, dla którego trudno wskazać geny dominujące odpowiedzialne za to zjawisko, a tym samym utrudnia to zastosowanie metod biotechnologicznych pozwalających na uzyskanie znacznego postępu w hodowli ukierunkowanej na zwiększenie odporności na stres suszy. Przedstawiła natomiast możliwość ingerencji w strefę owocowania roślin strączkowych, która może być szansą na poprawienie plonowania u roślin tych gatunków.

Bardzo szeroko omówiła wskaźniki tolerancji stresu suszy m. in. poliaminy, cukry, barwniki fotosyntetyczne, hormony roślinne. Zwróciła również uwagę na możliwość zastosowania biostymulatorów, które pozytywnie wpływają na różne procesy fizjologiczne w warunkach stresowych. W zakończeniu przeglądu literatury Autorka przedstawia możliwość wykorzystania zmienności epigenetycznej na wzrost i rozwój następnego pokolenia.

Ten rozdział pracy wskazuje na bardzo dobrą znajomość literatury krajowej i zagranicznej przedmiotu i umiejętność jej wykorzystania w precyzyjnie sformułowanym celu pracy i zaplanowaniu badań. Cel pracy informuje o poszukiwaniu fizjologicznych i biochemicznych wskaźników tolerancji na stresse środowiskowe, szczególnie stres suszy, które pozwolą na uzyskanie stabilniejszego plonu u roślin strączkowych. Zakłada również możliwość zwiększenia plonu poprzez ingerencję w strefę owocowania oraz ocenę efektywności działania wybranych stymulatorów roślinnych w łagodzeniu skutków stresu suszy. Przedstawiony cel osiągnęła poprzez zrealizowanie siedmiu celów pośrednich dla których zakładane były kolejne doświadczenia.

Badania przeprowadzono na bardzo obszernym materiale pięciu gatunków roślin strączkowych. Materiałem do badań było pięć odmian grochu siewnego, siedem odmian łubinu żółtego, dwie odmiany łubinu białego, dwie odmiany łubinu wąskolistnego i dwie odmiany soi uprawnej. Odmiany poszczególnych gatunków badane były w kolejnych doświadczeniach.

Metodyka badawcza obejmowała 11 kolejno dobrze przemyślanych i zaplanowanych doświadczeń, które pozwoliły na realizację założonego celu. W pierwszym doświadczeniu porównano efektywność plonowania różnych części strefy owocowania 5 badanych gatunków. W następnym doświadczeniu przeprowadzono ogławianie roślin zakładając, że zabieg ten może zwiększyć plon poprzez zmniejszenie aborcji kwiatów i wytworzenie większej liczby strąków. W kolejnym doświadczeniu określono wpływ przedsięwziętego pobudzania nasion oraz kiełkowanie w chłodzie zakładając, że zabiegi te mogą mieć wpływ na wysokość strefy owocowania i elementy struktury plonu. W kolejnych 2 doświadczeniach oznaczono potencjalne wskaźniki stresu suszy w fazie siewek i fazie kwitnienia. Pozostałe doświadczenia obejmowały badania wpływu hormonów roślinnych i stymulatorów na łagodzenie skutków suszy, stresów środowiskowych oraz ich wpływu na wysokość strefy owocowania i elementy struktury plonu. W ostatnim doświadczeniu oceniono zależność między ekspozycją na suszę w okresie wykształcania nasion a stopniem tolerancji na ten stres w następnym pokoleniu. W pracy przedstawiono warunki wzrostu roślin w doświadczeniach szklarniowych, wazonowych i polowych. Scharakteryzowano warunki pogodowe podczas wegetacji roślin, choć szkoda, że nie podano średnich temperatur i opadów w tym okresie. Bardzo szczegółowo przedstawiono metodykę pomiarów parametrów fizjologicznych, biochemicznych i analiz proteomicznych. Scharakteryzowano zastosowane w doświadczeniach hormony i stymulatory roślinne.

Najobszerniejszym rozdziałem są bardzo szczegółowo omówione wyniki poparte odpowiednio dobranymi analizami statystycznymi. Wykazano, że produktywność roślin różnych części strefy owocowania była zróżnicowana u badanych gatunków i odmian. Autorka stwierdziła, że niezależnie od położenia kwiatów na roślinie i procentu aborcji plon nasion z rośliny rekompensowany był MTN lub ilością nasion w strąku. Podobnie zróżnicowaną reakcją ogławiania roślin obserwowano w zależności od gatunku i odmiany. Ogławianie istotnie wpłynęło na plon nasion z rośliny poprzez wzrost MTN u odmian łubinu białego oraz u jednej z odmian soi i grochu. U pozostałych odmian i gatunków obserwowano spadek plonu z rośliny. W kolejnym doświadczeniu wykazano zróżnicowany wpływ pobudzania nasion (nawilżania oraz nawilżania i suszenia) odmian grochu i łubinu żółtego na kiełkowanie w niskich temperaturach i elementy struktury plonu oraz wysokość strefy owocowania. U odmian grochu uzyskano korzystne obniżenie strefy owocowania podczas kiełkowania w chłodzie. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość ingerencji w strefę owocowania, która może poprawić plonowanie poprzez obniżeniem strefy owocowania u grochu siewnego. U odmian łubinu żółtego takiej zależności nie obserwowano.

Poszukiwanie potencjalnych wskaźników tolerancji stresu suszy w fazie siewek u odmian grochu i łubinu żółtego wydaje się ciekawym podejściem, gdyż selekcję można byłoby prowadzić we wczesnych fazach rozwoju rośliny. Z przebadanych wskaźników najbardziej przydatną okazała się zawartość poliamin, która u odmian tolerancyjnych na stres suszy przyjmowała niższe wartości. Wystąpiły natomiast różnice w składzie i ilości poliamin badanych gatunków. Dla pozostałych potencjalnych wskaźników tolerancji stresu suszy:

uwodnienie tkanek, zawartości cukrów rozpuszczalnych, barwników fotosyntetycznych, związków fenolowych oznaczonych w różnych organach siewek wyniki charakteryzowały się brakiem zróżnicowania lub dużym zróżnicowaniem dla którego trudno było uchwycić różnice pomiędzy odmianami tolerancyjnymi i wrażliwymi na suszę. Stąd też trudno wykorzystać je jako wskaźniki odporności na stres suszy u badanych gatunków. Dociekliwość badacza skłoniła Doktorantkę do wykonania podobnych oznaczeń w późniejszych fazach rozwoju (w fazie kwitnienia i zawiązywania strąków) i odniesienia wyników do elementów struktury plonu. Takie podejście pozwoliło na określenie przydatności tych wskaźników. Susza w zróżnicowany sposób wpływała na zmiany wskaźników fizjologicznych u odmian wrażliwych i tolerancyjnych. Zróżnicowanie obserwowano również pomiędzy gatunkami. Spośród badanych wskaźników interesujące wyniki uzyskano dla zawartości poliamin. U wszystkich badanych gatunków roślin zaobserwowano wzrost stężenia kadaweryny podczas stresu suszy. U większości odmian wrażliwych na suszę stwierdzono wzrost stężenia ABA. Przydatnym wskaźnikiem dla oceny odporności na stres suszy okazał się współczynnik dyskryminacji izotopu ^{13}C . U wszystkich analizowanych odmian z wyjątkiem mało wrażliwych na suszę grochów w warunkach suszy współczynnik dyskryminacji izotopu ^{13}C był niższy u bardziej odpornych odmian. Uzyskane wskaźniki suszy charakteryzowały się dużą zmiennością i trudne były w interpretacji. Obliczenie korelacji pomiędzy badanymi wskaźnikami a zmianami masy nasion z rośliny pozwoliło precyzyjnie ocenić wagę poszczególnych wskaźników, a tym samym ich przydatność w przewidywaniu wielkości plonu w warunkach suszy. Spośród badanych wskaźników stężenie poliamin, kwasu abscynowego oraz stosunek stężeń izotopów $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ okazały się najbardziej przydatne w ocenie tolerancji stresu suszy. Kolejnym etapem badań było zastosowanie stymulatorów w łagodzeniu skutków stresu suszy glebowej oraz skutków stresów środowiskowych. Doktorantka założyła, że mogą one poprawić plonowanie w warunkach stresowych. Zastosowane stymulatory okazały się efektywne w łagodzeniu skutków suszy u obydwu odmian grochu. Największy wzrost plonu zaobserwowano pod wpływem ASAHI i ZEN. U odmian łubinu żółtego nie stwierdzono wpływu stymulatorów na plon w warunkach suszy. W warunkach doświadczeń polowych najefektywniejszymi stymulatorami plonowania odmian grochu i łubinu żółtego, które oddziaływały poprzez wzrost liczby kwiatów, strąków, a także MTN i liczbę nasion w strąku okazały się: ASAHI i ZEN. W kolejnym doświadczeniu badano wpływ różnych stężeń i różnych kombinacji najbardziej efektywnych stymulatorów (ASAHI i ZEN) na elementy struktury plonu u odmian grochu siewnego i łubinu żółtego. U wszystkich odmian badanych gatunków oprysk roztworami stymulatorów wpłynął na wzrost plonu nasion. U odmian łubinu roztwory stymulatorów zwiększyły wszystkie elementy struktury plonu. Porównanie działania mieszanek obydwu stymulatorów i pojedynczych składników na plon nasion wykazało silniejsze działanie pojedynczych stymulatorów. Autorka słusznie zauważa, że ZEN i ASAHI nie współdziałały ze sobą, co może wskazywać na oddziaływanie obydwu stymulatorów na te same procesy fizjologiczne.

W kolejnym doświadczeniu Doktorantka zbadała efektywność wybranych stymulatorów i roślinnych regulatorów wzrostu (ASAHI, ZEN, BAP, EPI i GA3) na parametry plonu pięciu

gatunków roślin strączkowych. Obserwowano zróżnicowaną reakcję roślin na zastosowane stymulatory, która wyrażała się zróżnicowanymi elementami struktury plonu. Wśród badanych gatunków soja najsilniej zareagowała wzrostem plonu po aplikacji większości stymulatorów wzrostu.

Porównując wyniki trzyletnich badań nad wpływem najefektywniejszych stymulatorów (ASAHI I ZEN) u odmian łubinu żółtego i grochu siewnego potwierdziła ich wpływ na elementy struktury plonu. U odmian łubinu żółtego wykazano znacznie większy wzrost plonu. Wystąpiło jednak znaczne zróżnicowanie w latach, które mogło wynikać z przebiegu warunków pogodowych w kolejnych latach jak również z badania różnych odmian.

Doktorantka podjęła również próbę sprawdzenia wpływu oprysku hormonami roślinnymi i stymulatorami w fazie siewek odmian łubinu żółtego i grochu na wzrost i rozwój roślin zakładając, że może on mieć na plonowanie. Opryski wykonane w tak wczesnej fazie wzrostu (5-6 liścia) okazały się nieefektywne. Wprawdzie obserwowano przyspieszenie początku kwitnienia, ale nie miało to związku z plonowaniem. Wyjątek stanowiła jedna odmiana łubinu żółtego Taper u której zaobserwowano wzrost plonu z jednoczesnym zwiększeniem liczby dolnych węzłów nieowocujących i skróceniem łodygi. U pozostałych odmian oprysk wpłynął na skrócenie łodygi i obniżenie plonu.

Ostatnim etapem badań było określenie wpływu suszy podczas wykształcania nasion na tolerancję na ten stres w następnym pokoleniu u odmian łubinu wąskolistnego i grochu siewnego. Nasiona wykształcone w warunkach suszy charakteryzowały się wyższą masą i energią kiełkowania. Rośliny potomne wykazywały większą tolerancję na ten stres, która była widoczna szczególnie u odmian łubinu, które charakteryzowały się korzystniejszymi parametrami fizjologicznymi i biochemicznymi. W badaniach tych wykazano również zwiększoną ekspresję białek u roślin otrzymanych z nasion zawiązanych w warunkach suszy. Wyniki te wskazują na występowanie „efektu rodzicielskiego”, ale wymagają kontynuowania badań dla dokładniejszego poznania mechanizmów tego zjawiska.

Przedstawiona obszerna i wnikliwa dyskusja świadczy o bardzo dobrej znajomości piśmiennictwa dotyczącego realizowanej tematyki. Autorka bardzo ciekawie przedstawiła dyskusję konfrontując wyniki własnych badań z wynikami badań innych autorów. Uzyskane wyniki były bardzo trudne w interpretacji, gdyż reakcja roślin na stres suszy była zróżnicowana zarówno pomiędzy gatunkami jak i w obrębie gatunku co wskazuje na istnienie różnych mechanizmów reakcji roślin na stres suszy i stresy środowiskowe, zarówno wspólnych jak i odrębnych dla badanych odmian i gatunków.

W podsumowaniu Doktorantka przedstawiła wyniki wspólne i różnicujące poszczególne gatunki i odmiany. We wnioskach przedstawiła najistotniejsze wyniki badań korespondujące z założonym celem pracy. Wnioski te mogą być przydatne w dalszych badaniach nad stabilnością plonowania roślin strączkowych w warunkach stresów środowiskowych.

Drobne uwagi, które nie umniejszają wartości pracy:

Str ii, 51 jest „analiza struktury plonu: powinno być „analiza elementów struktury plonu”

Str 44 jest „szybkość i zdolność kiełkowania” – powinno być „energia i zdolność kiełkowania”

- należałoby przedstawić warunki kiełkowania lub powołać się na przepisy ISTA

Str 112, tab.39 przedstawia zmiany stosunku analizowanych wskaźników a nie wartości procentowe

Str 113, tab.41 – zbyt duża precyzja przedstawionych wyników regresji wielorakiej

str 141, dośw. 10 – oprysk wykonano w fazie 5-6 liści

str 190, - odnosząc się do dośw. 10 Autorka podaje, że oprysk wykonano w fazie 6-8 liści

W pracy często powtarzają się drobne nieścisłości językowe, kiedy Autorka nie wykorzystuje wyników obliczeń statystycznych pisząc o mniejszych lub większych wartościach dobrze byłoby zaznaczyć czy były to istotne różnice czy nie istotne

Podsumowując stwierdzam, że praca została wykonana poprawnie pod względem metodycznym, posiada prawidłowy, czytelny układ. Doktorantka przedstawiła kompleksowe badania, które obejmowały aż 11 doświadczeń, w których dążyła do poprawy stabilności plonowania roślin strączkowych w warunkach stresów środowiskowych, ze szczególnym uwzględnieniem stresu suszy. Przedstawiona praca wskazuje na duże umiejętności Doktorantki w prowadzeniu badań poczynwszy od planowania doświadczeń przez wykonywanie różnych analiz laboratoryjnych po opracowanie statystyczne wyników. Przedstawiona praca wnosi nowe elementy poznawcze wzbogacające wiedzę o reakcji roślin strączkowych na stres przede wszystkim suszy i możliwość poprawy stabilności plonowania badanych gatunków uzasadniając jednocześnie konieczność ich kontynuacji.

Rozprawa mgr Agnieszki Kalandyk pt "Fizjologiczne wskaźniki tolerancji na suszę strączkowych roślin uprawnych i możliwość zwiększenia plonu w warunkach stresów środowiskowych" spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim. Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Agnieszki Kalandyk do publicznej obrony i z pełnym przekonaniem wnioskuję o wyróżnienie pracy.



Kraków, 1. 07. 2016 r.