

RECENZJA

rozprawy doktorskiej
Pani mgr Agnieszki Kalandyk

pt. „Fizjologiczne wskaźniki tolerancji na suszę strączkowych roślin uprawnych
i możliwości zwiększenia plonu w warunkach stresów środowiskowych”
wykonana na zlecenie Rady Naukowej
Instytutu Fizjologii Roślin
im. Fr. Górskiego PAN w Krakowie

Przedstawiona do recenzji dysertacja obejmuje 238 stron druku w ogólnie przyjętej strukturze głównych rozdziałów: wstęp, przegląd literatury, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis literatury. Pomocny dla czytelnika jest wykaz stosowanych skrótów umieszczony na początku rozprawy. Rozdziały główne podzielono na podrozdziały do trzeciego stopnia, co jest wystarczająco szczegółowe dla znalezienia poszukiwanego miejsca lub zagadnienia. Praca napisana jest ładnym, zrozumiałym językiem, łącznie z rzadko spotykaną, poprawną interpunkcją. Wyróżnić należy także stronę edytorską – odpowiednia wielkość i krój czcionki oraz umieszczenie tabel i rycin w treści ułatwiają czytanie rozprawy. Przy niewątpliwie dużej objętości Doktorantka zachowała właściwe proporcje między poszczególnymi rozdziałami. Ponad połowę przeznaczono na przedstawienie wyników i ich dyskusję.

Spis literatury obejmuje 365 pozycji w pełni odpowiadających tematyce rozprawy i świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki do przeprowadzonych badań. W przeglądzie literatury omówiono zarówno obiekty badań, tj. gatunki z rodziny *Leguminosae*, ich znaczenie w przyrodzie i rolnictwie, jak i problem badawczy, tj. stres suszy, jego wpływ na zmiany fizjologiczne u roślin i ich mechanizmy obronne oraz możliwości zmniejszenia strat plonu w warunkach stresu. Omówiono tu możliwości ingerencji w strefę owocowania, wskaźniki tolerancji stresu suszy (uwodnienie tkanek, występowanie poliamin i cukrów, barwników, związków fenolowych, hormonów itd.), stosowanie stymulatorów i hormonów jako alternatywy dla metod genetyczno-hodowlanych, łagodzących wpływ stresu oraz możliwości wykorzystania tzw. „efektu rodzicielskiego”. Doktorantka przyjęła hipotezę, że

indukowana stresem suszy, podwyższona aktywność niektórych genów w czasie zawiązywania nasion może w następnym pokoleniu zwiększyć zdolność roślin do ograniczenia uszkodzeń podczas suszy, natomiast biostymulatory o szerokim spektrum wpływu na wzrost i rozwój roślin mogą być skuteczną, o dużym znaczeniu praktycznym, alternatywą dla genetycznej odporności na warunki stresowe.

Tytuł rozprawy wskazuje na bardzo duże znaczenie przeprowadzonych badań. Wymieniony w nim główny cel dotyczy możliwości zwiększenia plonu w warunkach stresów. Zwiększenie plonu, jako główny cel doskonalenia roślin ma swoje uzasadnienie w konieczności wyżywienia wzrastającej liczby ludności. Przewiduje się, że w połowie bieżącego stulecia kulę ziemską będzie zamieszkiwać ponad 9 mld ludzi. Dla ich wyżywienia powinniśmy podwoić globalną produkcję roślinną, ale tylko 20% uzyskamy z wykorzystania dodatkowych obszarów uprawy, natomiast 80% musi pochodzić ze zwiększonej wydajności. Dotychczasowe sukcesy w doskonaleniu głównych roślin konsumpcyjnych były efektem poprawienia indeksu żniwnego, tj. zwiększenia rozwoju generatywnego kosztem masy wegetatywnej roślin. Dużych, dotychczas niewykorzystanych rezerw w plonowaniu należy się spodziewać w zwiększeniu efektywności procesów fizjologicznych, tymczasem stosowanie odpowiednich kryteriów „fizjologicznych” w selekcji hodowlanej należy do rzadkości. Poprawianie tej efektywności, a przynajmniej utrzymanie w warunkach stresowych stanowi dodatkową trudność. A w takich warunkach najczęściej przebiega wzrost i rozwój jarych roślin strączkowych, narażonych na niedobór i niekorzystny rozkład opadów atmosferycznych, skutkujący niestabilnym plonowaniem. Na tej podstawie Doktorantka zdefiniowała dwa główne cele: określenie fizjologicznych i biochemicznych wskaźników tolerancji na suszę wybranych roślin strączkowych oraz znalezienie efektywnych stymulatorów roślinnych w łagodzeniu negatywnego wpływu suszy. Dla ich realizacji pomocna miała być weryfikacja kilku hipotez (przedstawione na str. 32 dysertacji i w planie doświadczeń – s. 34-41) dla których przyjęto plan doświadczeń, odpowiedni materiał i metody. Dodatkowo weryfikacja hipotezy o wpływie tzw. „efektu rodzicielskiego” mogłaby także wskazać możliwości zwiększenia tolerancji na stres roślin następnego pokolenia.

Materiałem badawczym były odmiany 5 gatunków roślin strączkowych: 6 odmian grochu, 7 odmian łubinu żółtego, po 2 odmiany łubinu białego i wąskolistnego oraz 2 odmiany soi, pochodzące z krajowych ośrodków hodowli. Odmiany te uczestniczyły w 11 doświadczeniach, przeprowadzonych w latach 2011-2013 w warunkach polowych, szklarniowych i tunelu foliowego. Każde z doświadczeń poświęcone było innej hipotezie badawczej, np. efektywności wykształcania strąków w różnych strefach owocowania, wpływowi ogławiania na aborcję kwiatów, wpływowi przedsewnego traktowania nasion na wzrost i rozwój roślin, poszukiwaniu fizjologicznych i biochemicznych wskaźników tolerancji na suszę, czy poszukiwaniu stymulatorów, które łagodzą efekt suszy lub hormonów wpływających na wielkość i elementy struktury plonu. W doświadczeniach tych uczestniczyły odmiany dwu gatunków (groch i łubin żółty) lub wszystkich pięciu, wymienionych w rozdziale Materiał i metody (groch, trzy gatunki łubinu i soja).

W realizacji badań Doktorantka wykazała się znajomością szerokiego spektrum metod i technik, od pomiarów parametrów fizjologicznych, analiz biochemicznych i proteomicznych po analizę struktury plonu i metody statystyczne analizowania danych.

Dotychczasowe podsumowanie obejmuje ocenę przygotowania Doktorantki, sformułowania hipotez i celu badań, zaplanowania doświadczeń, metod i technik oraz całościowego opracowania dysertacji. Oczywiście najważniejsze są uzyskane wyniki. Te przedstawiono na ponad stu stronach omawiając 78 tabel i 30 rycin. Zatem materiał wynikowy był szczególnie bogaty. Należy podkreślić, że Doktorantka bardzo dobrze zapanowała nad ogromem wyników, nie tylko szczegółowo przedstawiła i komentowała zawartość dokumentacji, ale także przeprowadziła logiczną dyskusję i syntetyczne wnioskowanie. Ułatwiło to podzielenie materiału wynikowego na cztery obszary: wykorzystanie cech roślin oraz ingerencja w ich strefie owocowania, wskaźniki tolerancji na suszę, zastosowanie stymulatorów w łagodzeniu skutków działania stresów oraz ocena i możliwości wykorzystania efektu rodzicielskiego.

Gatunki roślin strączkowych różnią się pod względem pokroju, tj. budową i osadzaniem kwiatostanów oraz wytwarzaniem rozgałęzień bocznych. Ma to związek z plonowaniem, którego najważniejszym komponentem jest liczba wykształconych

strąków, kontrolowana przez czynniki genetyczne i środowiskowe. Podjęte próby ingerencji w strefę owocowania poprzez ogławianie i przedsiewne traktowanie nasion nie przyniosły jednoznacznych wyników, pomimo zróżnicowanego materiału, tak pod względem gatunkowym, jak i odmianowym (np. różny typ rozwoju grochu i łubinów, typów tradycyjnych i samokończących). Zatem nie tędy droga.

Najwięcej uwagi poświęcono dwu zagadnieniom: poszukiwaniu wskaźników tolerancji na suszę oraz substancji aktywnych, które zastosowane na rośliny w fazie siewki lub kwitnienia mogłyby złagodzić efekty działania stresów środowiskowych. Każde z tych zagadnień mogłoby stanowić temat oddzielnej rozprawy doktorskiej i każde ma duże znaczenie praktyczne. Podstawowym, jednoznacznym wskaźnikiem tolerancji roślin na stresy jest plon, ale oznaczamy go dopiero na końcu wegetacji roślin. Badacz, a z oczywistych względów także hodowca, zainteresowany jest wskaźnikami mierzonymi we wczesnych stadiach wegetacji, nadającymi się do wykorzystania w masowej selekcji. W doświadczeniach własnych Doktorantka analizowała szerokie spektrum potencjalnych wskaźników: uwodnienie tkanek, zawartość 6 poliamin, cukrów rozpuszczalnych, barwników fotosyntetycznych, związków fenolowych i fitohormonów oraz wartość współczynnika dyskryminacji izotopu ^{13}C . Warto podkreślić, że wśród poliamin uwzględniono agmatynę i 1,6 diaminoheksan – rzadko oznaczane przez innych autorów oraz wskaźnik grup aminowych, który pozwolił wykazać, że jednym z mechanizmów obrony przed stresem odmian bardziej tolerancyjnych jest zwiększenie udziału poliamin o większej liczbie grup aminowych. Najsilniejszą korelację z plonem wykazała suma poliamin oraz stężenie kwasu abscyzynowego, co sugeruje ich przydatność, jako wskaźników tolerancji na suszę. Bardzo wartościowym dla badacza/hodowcy uzupełnieniem powyższego wniosku jest opracowana przez Doktorantkę tabela (nr 79) podsumowująca użyteczność z uwzględnieniem skuteczności, szybkości, dostępności i kosztów.

Równie ważne, ale o większym znaczeniu dla praktycznego, niemal bezpośredniego wykorzystania są wyniki badań nad zastosowaniem stymulatorów w łagodzeniu skutków suszy. Doświadczenia przeprowadzono zarówno w warunkach kontrolowanych, jak i polowych, u których testowano przydatność dużego spektrum

środków (także w dawkach kombinowanych) o zróżnicowanym oddziaływaniu na rośliny, stosowanych w fazie siewek dla poprawienia wysokości strefy owocowania, jak i w fazie kwitnienia dla złagodzenia ujemnego działania suszy na plonowanie. Wybór stymulatorów o zróżnicowanym wpływie na rośliny był ważny ze względu na złożoność procesu i mało poznane przyczyny odporności/tolerancji roślin na suszę. Badano 10 stymulatorów pobudzających wzrost i rozwój roślin w tym wzrost komórek, intensyfikację procesów biochemicznych, czy sygnalizację oksydacyjną. Stwierdzono małą efektywność oprysku stymulatorami przed kwitnieniem, natomiast najefektywniejsze dla grochu i łubinu przy stosowaniu w warunkach polowych w fazie kwitnienia okazały się preparaty ASAHI i ZEN; korzystnie wpływały na wzrost komponentów struktury plonu – liczbę strąków, nasion i MTN. W konsekwencji Doktorantka proponuje stosowanie w praktyce preparatu ASAHI, który jest tańszy i pozbawiony wątpliwości, co do skutków ubocznych. Osiągnięcie to należałoby jednak zweryfikować w uprawowych doświadczeniach łanowych, a potwierdzone, mogłoby stanowić duży wkład w zwiększeniu stabilności plonowania roślin strączkowych w praktyce rolniczej.

Ostatnia, weryfikowana przez Doktorantkę hipoteza zakładała, że susza w okresie wzrostu i dojrzewania nasion można zwiększyć tolerancję na ten stres u roślin następnego pokolenia. Przy jej formułowaniu uwzględniono dane literaturowe wskazujące, że kształtowanie się roślin następnego pokolenia jest uzależnione od warunków dojrzewania roślin macierzystych, ich wieku, lokalizacji nasion na roślinie, temperatury otoczenia, warunków świetlnych, dostępności wody, itp. Przyjmuje się, że rolę odgrywać może podwyższona stresem suszy aktywność niektórych genów w czasie zawiązywania nasion, utrzymująca się w następnym pokoleniu. Założenie to bardziej odpowiada epigenetyce, niż genetyce klasycznej, w której źródłem zmienności są jedynie mutacje i rekombinacje. Chociaż trzeba także brać pod uwagę, że u roślin strączkowych liścienie nasion należą do następnego pokolenia, a efekt somatyczny w nasiennictwie znany i uwzględniany jest od dawna. Na podstawie uzyskanych wyników, świadczących o występowaniu tzw. efektu rodzicielskiego Doktorantka postawiła wniosek o lepszej tolerancji na suszę roślin, które wyrosły z nasion wykształconych w warunkach stresowych. Wniosek jest uzupełniony sugestią o

wykorzystaniu tego zjawiska w gospodarce nasiennej. Ze względu na potencjalnie duże znaczenie, ale jednocześnie istotne moim zdaniem trudności organizacyjne we wprowadzeniu do praktyki, wymaga on dodatkowych, potwierdzających i wyjaśniających badań.

Do całości rozprawy i Doktorantki mam kilka uwag i pytań:

- przegląd literatury rozpoczyna się użyciem trzech terminów dla badanej grupy gatunków (strączkowe, bobowate, motylkowe). Dziś nazewnictwo jest uporządkowane, chociaż niejednoznaczne. Dla rodziny można stosować wymiennie nazwy Leguminosae (strączkowe) lub Fabaceae (bobowate). Nauka i praktyka stosują pierwszą nazwę, a urzędy (UPOV, COBORU) drugą. Odsyłam do zaleceń Ogrodu Botanicznego w Kew (Legumes of the World, 2005, Kew, wyd. G. Lewis i in.) i International Code for Botanical Nomenclature,
- w 11 doświadczeniach dla weryfikacji różnych hipotez występują różne obiekty. Należałoby wyjaśnić, jakie były ku temu przesłanki, gdyż nasuwa się sugestia badania jednakowych gatunków i odmian we wszystkich doświadczeniach,
- w pomiarach parametrów fizjologicznych nasion uwzględniono szybkość i zdolność kiełkowania. Należało przyjąć, a przynajmniej odnieść się do międzynarodowych parametrów ISTA i krajowych, zawartych w Ustawie o Nasiennictwie. Dla zdolności kiełkowania określa się % -ową liczbę dni i warunki właściwe dla każdego gatunku, a nieformalny parametr - energia kiełkowania wstępnie określa równomierność wschodów,
- w analizie struktury plonu przyjęto 12 parametrów (s. 51-52). Dla roślin strączkowych przyjmuje się 3 podstawowe komponenty plonu nasion: liczba strąków, liczba nasion i MTN. Pozostałe można było opisać w metodyce, jako cechy/składniki uzupełniające,
- termin „kontrola”. Powinno być rośliny/odmiany/poletka kontrolne,
- w opisie materiału i dyskusji brakuje rozróżnienia między dwoma typami wzrostu i rozwoju roślin strączkowych, co byłoby ważne przy weryfikowaniu hipotezy dotyczącej zmniejszenia aborcji kwiatów przez ogławianie. Samokończenie w typie łubinowym polega na niewytwarzaniu rozgałęzień bocznych (kwiatostan z natury ma charakter terminalny), a u grochu i bobiku na genetycznym

„ogłowieniu” stożka wzrostu. Tu kwiatostany przestają rozwijać się na kolejnych węzłach i łodyga kończy wzrost wytworzeniem terminalnego kwiatostanu.

Podsumowując całość rozprawy jeszcze raz stwierdzam jej bardzo dużą wartość zarówno pod względem naukowym, jak i praktycznego znaczenia uzyskanych wyników. Ocena powyższa dotyczy zarówno przygotowania Doktorantki do badań, opracowania założeń metodycznych i realizacji doświadczeń, uzyskanych wyników i całości opracowania redakcyjnego dysertacji. Rozprawa Pani mgr Agnieszki Kalandyk spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w ustawie z 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852). Wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Fizjologii Roślin im. F. Górskiego PAN w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr A. Kalandyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wysoka ocena wartości merytorycznej dysertacji, a szczególnie sformułowanie hipotez badawczych, szerokie spektrum doświadczeń i metod zastosowanych do ich weryfikacji oraz wartość praktyczna wyników dotyczących zwłaszcza znalezionych wskaźników tolerancji roślin strączkowych na suszę i możliwości stosowania stymulatorów plonowania uzasadniają postawienie wniosku o wyróżnienie.

Poznań, dn. 29.07.2016 r.


Prof. dr hab. Wojciech Święcicki