



Dr hab. inż. Iwona Żur, prof. nadzw. IFR PAN
Instytut Fizjologii Roślin im. *Franciszka Górskiego*
Polska Akademia Nauk
Niezapominajek 21, 30-239 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. **Marii Tatrzańskiej-Matuły**
pt. **„Zbadanie fizjologicznych mechanizmów tolerancji wybranych gatunków
jednoliściennych roślin uprawnych na wysokie zasolenie gleby”**

wykonanej w Instytucie Fizjologii Roślin im. *F. Górskiego* Polskiej Akademii Nauk w Krakowie
w ramach Studium Doktoranckiego Nauk Przyrodniczych PAN w Krakowie

Zasolenie gleby określane jest przez zawartość łatwo rozpuszczalnych soli, zawierających w swoim składzie aniony: chlorkowe (Cl^-), siarczanowe (SO_4^{2-}) i azotanowe (NO_3^-) oraz kationy: sodu (Na^+) i potasu (K^+). Wg danych FAO (FAO Land and Plant Nutrition Management Service), na świecie problem zasolenia dotyczy ponad 6% powierzchni lądowej (ponad 400 mln ha). Co więcej powierzchnia ta rośnie w tempie ok. 1-2% rocznie. W Polsce szacunkowy areał gleb naturalnie zasolonych nie jest duży, wynosi nieco ponad 5400 ha i dotyczy trzech obszarów: nadmorskiego, środkowopolskiego i podkarpackiego. Ich występowanie związane jest ze stałym dopływem wód zawierających sole łatwo rozpuszczalne, mineralne lub morskie. Większy problem stanowi natomiast zasolenie o charakterze antropogenicznym, które dotyczy przede wszystkim dużych ośrodków przemysłowych, powstałych w okolicach występowania naturalnych kopalin, takich jak węgiel kamienny, sól kamienna czy rudy miedzi. Zasolenie gleb może też być skutkiem nieprawidłowego składowania odpadów przemysłowych, wykorzystywania soli mineralnych do odładzania dróg, stosowania intensywnego nawożenia mineralnego, oraz nawadnianie pól wodą z naturalnych, zasolonych zbiorników wodnych. Niekiedy zasoleniu mogą ulegać gleby uprawne wysokiej klasy, o dużej wartości użytkowej. Jedną z najprostszych metod rekultywacji gleb zasolonych jest wykorzystanie naturalnych zdolności roślin do pobierania cząsteczek i związków chemicznych przez system korzeniowy i rozkładania lub wiązania i akumulacji w częściach nadziemnych. Warunkiem zastosowania metody fitoremediacji jest wykorzystanie roślin tolerujących zasolenie w stopniu, umożliwiającym rozwój i pobieranie soli z roztworu glebowego, których coroczna uprawa pozwala na uzyskanie dużej biomasy.

Podsumowując powyższe stwierdzenia, uważam że podjęcie badań mających na celu określenie reakcji i poszukujących fizjologicznych markerów tolerancji różnych gatunków jednoliściennych na wysokie zasolenie gleby należy uznać za uzasadnione.

Rozprawa doktorska została wykonana w ramach Studium Doktoranckiego Nauk Przyrodniczych Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, stanowiąc część projektu Akcji COST FA0605 pt. "Określenie zdolności wybranych gatunków roślin uprawnych do wzrostu w warunkach zasolonej gleby oraz zbadanie efektywności chemicznych stymulatorów wzrostu i czynników stresowych w łagodzeniu skutków zasolenia" koordynowanego przez prof. dr hab. Franciszka Duberta. Część eksperymentalną wykonano w Zakładzie Biologii Rozwoju Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Płazek, z Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie.

W ramach pracy doktorskiej wykonano trzy dwuczynnikowe eksperymenty, w kontrolowanych warunkach szklarniowych (doświadczenie wazonowe) i w otwartym tunelu foliowym (doświadczenie „basenowe”). Celem przeprowadzonych doświadczeń było: (1) określenie wpływu ciągłego stresu zasolenia na parametry wzrostu i wybrane procesy fizjologiczne oraz próby łagodzenia skutków zasolenia poprzez (2) zastosowanie biostymulatorów oraz (3) okresowe przerywanie ciągłości stresu solnego (naprzemienne podlewanie wodą słodką i słoną). Badania przeprowadzono na pięciu gatunkach roślin jednoliściennych: dwóch odmianach pszenicy zwyczajnej, odmianie i rodzie pszenicy twardej, po jednej odmianie kukurydzy i sorga oraz miskancie olbrzymim, w sumie na siedmiu obiektach. Ich specyfiką było utrzymywanie roślin w warunkach stresu solnego od momentu kielkowania, a w przypadku miskanta od momentu wysadzenia kłączy, co odpowiada naturalnym warunkom wzrostu roślin na glebach zasolonych. Stres zasolenia imitowano poprzez nawadnianie roślin roztworami NaCl w stężeniach od 20 do 150 mM (20-200 mM w przypadku miskanta olbrzymiego). Zastosowany zakres stężeń został wybrany na podstawie doświadczenia wstępnego, celem którego było określenie górnej granicy stężenia NaCl tolerowanej przez kielkujące nasiona poszczególnych gatunków. Przeprowadzenie wstępnych analiz pozwoliło również na określenie wskaźnika wrażliwości na zasolenie (SSI) badanych materiałów. Trudno jednak uznać, by wyniki eksperymentu przeprowadzonego w warunkach *in vitro*, w którym nasiona układano na szalkach na bibule filtracyjnej nasączonej odpowiednimi roztworami NaCl mogły być adekwatne w stosunku do doświadczeń wazonowych, prowadzonych na podłożu glebowym czy doświadczeń prowadzonych w basenach wypełnionych perlitem.

W eksperymencie zasadniczym prowadzonym równoległe w warunkach szklarniowych i w tunelu foliowym, analizę wpływu zasolenia przeprowadzono po 6 tygodniach wzrostu w warunkach stresu zasolenia. Wykonano pomiary szeregu parametrów fizjologicznych i biochemicznych: świeżej i suchej masy, intensywności transpiracji (E), przewodnictwa szparkowego (g_s), intensywności fotosyntezy netto (P_N), parametrów kinetyki fluorescencji chlorofilu a, wypływu elektrolitów (WE), względnej zawartości wody (RWC) i zawartości wolnej proliny. W przypadku doświadczenia „basenowego” pomiary uzupełniono o względną turgorescencję (RT), aktywność enzymów antyoksydacyjnych i całkowitą zawartość białka.

W formie doświadczenia „basenowego” wykonano również eksperyment testujący możliwość łagodzenia skutków stresu solnego poprzez zastosowanie biostymulatorów: epibrasinolidu, zearalenonu i preparatu ASAHI, zawierającego substancje aktywne z grupy nitrofenoli. W tym

przypadku podstawowe analizy fizjologiczne uzupełniono o analizy zawartości chlorofilu a i b, zawartości jonów wapniowych, magnezowych, fosforowych, potasowych i sodowych, oraz zawartość kwasu abscysynowego (ABA) i węglowodanów rozpuszczalnych. *Wątpliwości budzi fakt zastosowania tylko jednego stężenia dla każdego z preparatów i pojedynczego terminu oprysku roślin. Ponieważ w pracy brak informacji na jakiej podstawie zostały wybrane te parametry, w tym miejscu proszę Doktorantkę o odnośne wyjaśnienia.*

W ostatnim z eksperymentów zbadano wpływ przerywania 'ciągłości' stresu solnego poprzez jednodniowe nawadnianie czystą wodą, po każdym 3 lub 6 dniach wegetacji w warunkach zasolenia. Oprócz podstawowych parametrów (świeżej i suchej masy, RWC, RT, zawartości głównych składników mineralnych, WE), jako dodatkowy parametr zastosowano zawartość dialdehydu malonowego (MDA).

Szeroki zakres badań oraz spora liczba obiektów badawczych jest z jednej strony godna uznania ze względu na nakład pracy włożony w realizację badań, z drugiej strony jednak budzi wątpliwości, co do możliwości znalezienia jednoznacznej odpowiedzi na postawione pytania. Co więcej, część analiz wykonywano tylko w pojedynczych eksperymentach np. bardzo istotne z punktu widzenia odpowiedzi na stres pomiary stężenia ABA, aktywności enzymów antyoksydacyjnych czy stężenia MDA, lub z wyłączeniem niektórych obiektów (np. miskanta olbrzymiego). Taki układ doświadczeń utrudnia wiarygodną analizę danych i właściwą interpretację uzyskanych wyników.

Ocena struktury pracy:

Rozprawa liczy 139 stron i została podzielona na 7 głównych rozdziałów (Wstęp, Cel pracy, Materiał i Metody, Metodykę analiz fizjologicznych i biochemicznych, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie i Wnioski). Zawiera również Wykaz stosowanych skrótów, Spis treści, Spis literatury i Streszczenia w języku polskim i angielskim. Większość rozdziałów zawiera podrozdziały porządkujące zamieszczone treści. Do tekstu dołączono 31 tabel, 4 wykresy oraz 14 fotografii, dokumentujących przebieg eksperymentów i uzyskane wyniki.

Układ pracy jest poprawny pod względem formalno-metodycznym, aczkolwiek wyróżnienie opisu przeprowadzonych analiz w odrębnym rozdziale wykracza poza standardowe praktyki.

Uwagi dotyczące poszczególnych rozdziałów:

Wykaz stosowanych skrótów zawiera 29 pozycji, i stanowi przydatne zestawienie pełnych nazw stosowanych związków, wskaźników i parametrów.

Na **Wstęp** składają się 34 strony stanowiąc 24% objętości całej rozprawy. W rozdziale tym, Doktorantka przedstawiła definicję zasolenia, przyczyny powstawania gleb zasolonych oraz rozmiar tego problemu w odniesieniu do światowych zasobów ziem uprawnych. Następnie Doktorantka opisała wpływ zasolenia gleby na wzrost roślin, poszczególne procesy metaboliczne i wybrane parametry fizjologiczne i biochemiczne. Kolejne podrozdziały zawierają opis reakcji obronnych uruchamianych przez rośliny w odpowiedzi na stres zasolenia oraz metody wykorzystywane do podnoszenia poziomu naturalnej tolerancji (biostymulatory) lub łagodzenia skutków zasolenia (naprzemienne podlewanie wodą słoną i słodką). Następnie Doktorantka przedstawiła bardzo obszerną charakterystykę botaniczną gatunków stanowiących obiekty badań niniejszej pracy. Na 13 stronach opisano niezwykle szczegółowo,

nie tylko znaczenie, cechy agronomiczne i wykorzystywanie, ale również pochodzenie i morfologię, co w mojej opinii jest niepotrzebne i nadmiernie wydłuża ten rozdział pracy.

Podsumowując tę część rozprawy doktorskiej stwierdzam, że Doktorantka wykazała się znajomością omawianego problemu badawczego, jasno formułując teoretyczne założenia pracy.

Cele pracy sformułowano jasno i przejrzysto. W obliczu wyzwań przed jakimi staje współczesne rolnictwo, podjęte badania nad możliwościami zastosowania niektórych gatunków roślin do rekultywacji i remediacji zdegradowanych gleb oraz próby identyfikacji mechanizmów i podniesienia tolerancji roślin na stres zasolenia wydają się w pełni uzasadnione. Podjęte zamierzenia wymagały przeprowadzenia rozległych badań i opracowania odpowiednich „narzędzi” i procedur badawczych.

W rozdziale **Materiał i metody**, Doktorantka przedstawiła pochodzenie wykorzystanych do badań materiałów roślinnych, schematy doświadczeń oraz wyniki wstępnych analiz określających rzeczywistą zawartość NaCl oraz innych składników mineralnych w podłożu glebowym. Przeprowadzone analizy pozwoliły na stwierdzenie, iż obserwowane efekty wzrostu w warunkach zasolenia są faktycznie wynikiem specyficznego działania tego stresu, a nie skutkiem wypierania przez jony Na^+ i Cl^- , innych jonów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania roślin. Wykonanie tego typu analizy świadczy o dobrej znajomości problematyki stanowiącej przedmiot pracy. Rozdział zawiera również opis specjalnie skonstruowanych na potrzeby projektu, basenów doświadczalnych z systemem drenażu, nawadniania i nawożenia oraz zapis średnich parametrów charakteryzujących warunki pogodowe w trakcie trwania eksperymentu w otwartym tunelu foliowym. Kolejne podrozdziały zawierają szczegółowy opis poszczególnych eksperymentów.

Nieuzasadnione wydaje się wyróżnienie osobnego rozdziału w postaci **Metodyki analiz fizjologicznych i biochemicznych**. Zazwyczaj zawarte w nim opisy metodyczne wykonywanych pomiarów i analizowanych parametrów stanowią integralną część powyżej opisanego rozdziału **Materiał i metody**. Nieco też nie przystaje zamieszczony tu opis metody analizy statystycznej, aczkolwiek prawidłowo dobranej do układu doświadczalnego (wieloczynnikowa analiza wariancji ANOVA, test Duncana, współczynnik korelacji liniowej).

W sumie oba rozdziały zawierające dane metodyczne zajmują 15 stron stanowiąc 11% objętości pracy doktorskiej. Opis metodyki jest jasny, co ze strony Doktorantki świadczy o dobrej znajomości zastosowanych metod i odpowiednim przygotowaniu merytorycznym. Nieliczne uwagi szczegółowe zaznaczono w tekście.

Rozdział **Wyniki** jest najdłuższą częścią pracy doktorskiej, zawiera 37 stron i stanowi 27% objętości rozprawy. W pierwszych podrozdziałach Doktorantka przedstawiła objawy i morfologię charakteryzujące rośliny rosnące w warunkach zasolenia, oraz wyniki eksperymentu wstępnego obrazujące zakres tolerancji kiełkujących nasion na stres zasolenia. Następnie przedstawiono wyniki doświadczenia wazonowego dotyczące wpływu wzrostu zasolenia na wybrane parametry i procesy metaboliczne u badanych gatunków roślin. Wyniki obejmują bardzo szeroki zakres parametrów i w większości przypadków wykazują wysoki poziom specyficzności dla poszczególnych gatunków i odmian. Jednymi z bardziej stabilnych

parametrów były zawartość świeżej i suchej masy roślin, która w przypadku obu gatunków pszenic ulegała stopniowemu obniżeniu wraz z rosnącym stężeniem NaCl. Towarzyszył im wyraźny spadek parametrów wymiany gazowej (P_N , E , g_s). Prawidłowości tej nie obserwowano jednak w przypadku dwóch pozostałych gatunków roślin, u sorga i kukurydzy, u których umiarkowany stres solny stymulował akumulację świeżej i suchej masy, a spadek parametrów wymiany gazowej obserwowano dopiero przy najwyższych tolerowanych stężeniach NaCl. Wzrost przepuszczalności membran komórkowych zanotowano jedynie w przypadku jednej z odmian pszenicy twardej (Komnata), począwszy od 40 mM NaCl.

Wyniki kolejnego doświadczenia przedstawione w pracy, dotyczą jedynie dwóch gatunków roślin: kukurydzy i sorga, rosnących w warunkach „basenowych”. W osobnym podrozdziale zebrano wyniki dotyczące miskanta olbrzymiego, wysadzanego w postaci kłaczy. Wzrost stężenia NaCl w podłożu (perlit) powodował istotny spadek świeżej i suchej masy części nadziemnych kukurydzy i sorga oraz kłaczy, pędów i liści miskanta olbrzymiego, a zakres tolerancji warunkowany był przez cechy genotypowe. Negatywny wpływ zasolenia na membrany komórkowe stwierdzono jedynie w przypadku miskanta nawadnianego roztworem 200 mM NaCl. U kukurydzy i miskanta obserwowano obniżenie wszystkich parametrów wymiany gazowej, podczas gdy u sorga istotne pogorszenie dotyczyło jedynie P_N w roślinach traktowanych 70 mM roztworem NaCl. U obu gatunków tj. u kukurydzy i sorga, przy wyższych wartościach zasolenia obserwowano wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy anionorodnika ponadtlenkowego i katalazy. Tylko w przypadku kukurydzy obserwowano natomiast również istotny wzrost aktywności peroksydazy, już od 20 mM NaCl. W kolejnym eksperymencie testowano wpływ trzech biostymulatorów wzrostu: zearalenonu, epibrasinolidu i komercyjnego preparatu ASAHI, jako czynników podnoszących tolerancję roślin na zasolenie. W tym miejscu sugeruję, co można uwzględnić przy przygotowywaniu pracy doktorskiej do druku, że bardziej klarowny byłby inny układ prezentacji danych, z wydzieleniem podrozdziałów demonstrujących wpływ wywierany przez poszczególne preparaty.

Generalnie, największy wpływ miało zastosowanie zearalenonu, wpływ pozostałych preparatów był bardziej gatunkowo-specyficzny i wybiórczy. Podsumowując uzyskane wyniki, można stwierdzić, że zastosowane preparaty nie wpłynęły istotnie na świeżą i suchą masę części nadziemnej opryskiwanych roślin. Jedyny korzystny efekt obserwowano w przypadku sorga traktowanego zearalenonem. Co ciekawe, w przypadku preparatu ASAHI obserwowano wyraźny wzrost świeżej i suchej masy korzeniowej u trzech na cztery badane gatunki. *Ponieważ opis preparatu zawarty we Wstępie jest dość enigmatyczny, moim drugim pytaniem skierowanym do Doktorantki jest prośba o bardziej szczegółowe wyjaśnienie roli, jaką w odpowiedzi na stresy mogą odgrywać substancje aktywne z grupy nitrofenoli.*

Podobny do ASAHI efekt, odnotowano w przypadku zearalenonu, ale tylko w odniesieniu do obu gatunków pszenic. Oprysk tą substancją wywoływał również gatunkowo-specyficzne zmiany przepuszczalności membran komórkowych i zawartości chlorofilu a i b, a u niektórych gatunków wzrost zawartości proliny i ABA.

Przerywanie ciągłości stresu solnego poprzez jednodniowe nawadnianie czystą wodą, (eksperyment 3) łagodziło skutki zasolenia w stosunku do rosnącej w warunkach stałego zasolenia (120 mM NaCl) kontroli, nie eliminowało jednak całkowicie niekorzystnych efektów np. spadku świeżej i suchej masy. Częstsze przerywanie stresu solnego ograniczało uszkodzenia błon komórkowych u obu gatunków pszenic, rzadsze - wywoływało ten sam efekt w przypadku kukurydzy. Zmiany zawartości MDA były wysoce uzależnione od cech genotypowych i trudne do jednoznacznej interpretacji.

Podsumowując tę część pracy, mogę stwierdzić, że bardzo obszerne wyniki doświadczeń, w których wykorzystano bardzo różnorodne metody analityczne są interesujące i zawierają elementy nowości. Niekompletny układ eksperymentów utrudnia jednak jednoznaczną interpretację i wyciągnięcie wiarygodnych wniosków.

Uzyskane wyniki zostały przedyskutowane w kolejnym rozdziale pracy i wykorzystane do sformułowania wniosków końcowych.

Dyskusja obejmuje 15 stron (11% objętości pracy) podzielonych na trzy podrozdziały, w których Doktorantka przeprowadziła porównanie uzyskanych wyników z danymi literaturowymi. W pierwszym podrozdziale Doktorantka odniosła się do wybranych parametrów jako potencjalnych markerów charakteryzujących intensywność stresu i poziom tolerancji rośliny oraz potencjalnych i obserwowanych skutków oddziaływania stresu zasolenia na poszczególne procesy fizjologiczne. W drugim podrozdziale dokonano analizy wyników dotyczących zastosowania biostymulatorów jako czynników podnoszących naturalną tolerancję na stres zasolenia. Doktorantka przedstawiła dane dotyczące mechanizmów działania poszczególnych substancji czynnych oraz wyniki badań innych autorów dokumentujące efektywność zastosowanych preparatów. Ostatni z podrozdziałów odnosi się do wyników eksperymentu z naprzemiennym podlewaniem, w którym Doktorantka podjęła próbę wyjaśnienia obserwowanych efektów. W Dyskusji Doktorantka zacytowała szereg prac, zarówno polsko- jak i obcojęzycznych, w tym dużą część z ostatniego dziesięciolecia.

Rozdział **Podsumowanie i wnioski** zawiera w większości stwierdzenia podsumowujące uzyskane wyniki. Doktorantka przedstawiła je w formie 11 punktów. Niektóre z nich wydają się nieuzasadnione (np. pkt.5, pkt.11). Może to wynikać z bardzo dużej ilości analizowanych danych.

Doktorantka wykazała się dobrą znajomością literatury polsko- i obcojęzycznej. **Spis**

Literatury zawiera 244 cytowane pozycje.

Praca napisana jest poprawnie, choć Doktorantka nie ustrzegła się przed sporą ilością błędów stylistycznych i interpunkcyjnych. Szczegółowe uwagi zaznaczono bezpośrednio w tekście.

Podsumowując całość pracy, na szczególne uznanie zasługują:

1) szeroki zakres prowadzonych badań (7 obiektów badawczych, zróżnicowane parametry charakteryzujące funkcjonowanie roślin w warunkach stresu) oraz związany z tym duży nakład pracy włożony w pozyskanie przedstawionych wyników,

- 2) związana z pkt.1 konieczność opanowania różnorodnych technik analitycznych, umiejętności obliczania wskaźników oraz interpretacji uzyskanych danych,
- 3) stworzenie odpowiednich narzędzi badawczych (doświadczenia basenowe) wymagające opracowania oryginalnych systemów obsługi (drenaż, nawadnianie, nawożenie),
- 4) zastosowanie nowego podejścia polegającego na utrzymywaniu roślin w warunkach stresu zasolenia od momentu kiełkowania, a w przypadku miskanta od momentu wysadzenia kłączy, co odpowiada naturalnym warunkom wzrostu roślin na glebach zasolonych,
- 5) z praktycznego punktu widzenia bardzo cenne wydają się stwierdzenia dotyczące stopnia tolerancji na zasolenie poszczególnych gatunków oraz możliwości łagodzenia skutków stresu zasolenia.

Oceniając całokształt rozprawy doktorskiej mgr inż. Marii Tatrzańskiej-Matuły pt. „Zbadanie fizjologicznych mechanizmów tolerancji wybranych gatunków jednoliściennych roślin uprawnych na wysokie zasolenie gleby” stwierdzam, że przedłożona do oceny praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Fizjologii Roślin im. F. Górskiego PAN w Krakowie o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 24.01.2016

Iwona Żur
.....
dr hab. inż. Iwona Żur,
prof. nadzw. IFR PAN