

Prof. dr hab. Marcin Rapacz
Katedra Fizjologii Roślin
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy *im. Hugona Kollątaja* w Krakowie
ul. Podłużna 3, 30-239 Kraków

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Tomasza Horaczka zatytułowanej
„Reakcja aparatu fotosyntetycznego roślin miskanta olbrzymiego (*Miscanthus x
giganteus* Anderss.) rosnących w warunkach niedoboru wybranych makroskładników w
podłożu”**

Rozprawa doktorska Pana Tomasza Horaczka dotyczy bardzo istotnego z rolniczego punktu widzenia zagadnienia jakim jest diagnostyka niedoboru składników mineralnych w roślinach. Rozwijanie metod diagnostycznych pozwalających na ścisłe określanie funkcjonalnych, a więc takich, które ujemnie wpływają na ilość i/lub jakość plonu, ma kapitalne znaczenie dla ograniczania ilości stosowanych nawozów zmniejszając niekorzystny wpływ upraw na środowisko. W ostatnim okresie postępuje gwałtowny rozwój takich metod z wykorzystaniem zarówno sensorów punktowych jak i zdalnych wykorzystujących też statki powietrzne, czy satelity. Wiele zagadnień nie jest jednak do końca rozwiązanych. Są problemy z odróżnianiem niedoboru poszczególnych pierwiastków, szczególnie jeśli niedobór ma charakter kompleksowy, często połączony dodatkowo z działaniem innych czynników niekorzystnych. Istnieje ponadto konieczność dostosowania protokołów pomiarowych i algorytmów (kluczy) diagnostycznych do poszczególnych gatunków roślin. W swojej rozprawie Doktorant zajął się dotychczas nieopracowanym pod tym względem gatunkiem jakim jest miskant olbrzymi. Roślina ta, ze względu na dużą produkcję biomasy jest narażona na deficyty składników pokarmowych, chociaż z drugiej strony dość dobrze wykorzystuje ich glebowe zasoby. Sam miskant jest rośliną rolniczo ważną i przyszłościową ze względu na możliwości wykorzystania technologicznego biomasy inne niż tylko spalanie oraz możliwość zastosowania w fitoremediacji gleb skażonych. Tak więc wydaje się, że tematyka rozprawy zasługuje na uwagę i może mieć duże znaczenie aplikacyjne.

Rozprawa licząca 170 stron napisana została w formie monografii w języku polskim.

We **wstępie** Doktorant w sposób czytelny i syntetyczny wprowadza czytelnika w tematykę pracy. **Przegląd literatury** zajmuje w rozprawie 62 strony i zawiera przy tym tabelę oraz kilka schematów ilustrujących omawiane zagadnienia. W przeglądzie literatury poruszone zostały w sposób kompetentny i uporządkowany trzy grupy zagadnień istotne z punktu widzenia tematyki rozprawy: 1) gospodarka mineralna roślin, 2) fluorescencja chlorofilu i jej zastosowania oraz 3) biologia, agrotechnika i zastosowanie miskanta olbrzymiego. W rozdziale tym omówiono też inne, poza fluorescencją chlorofilu metody wykrywania niedoborów składników pokarmowych u roślin. Ta część, chociaż niezbędna, jest nadmiernie rozbudowana, gdyż stopień szczegółowości opisu metod niestosowanych w trakcie wykonywania doświadczeń będących przedmiotem rozprawy jest taki sam jak w przypadku opisu pomiarów fluorescencji chlorofilu. Nie do końca zrozumiałe jest też umieszczenie podrozdziału dotyczącego wykorzystania miskanta olbrzymiego i innych gatunków roślin energetycznych w fitoremediacji gleb i fitoekstrakcji metali ciężkich co ma niewiele, poza gatunkiem, wspólnego z tematyką rozprawy. Następnie w rozprawie postawiono **hipotezę („tezę”)**, że „aparat fotosyntetyczny miskanta olbrzymiego jest wrażliwy na niedobór składników pokarmowych, a jego reakcja na zaistniały stres może być skutecznie mierzona za pomocą fluorescencji chlorofilu a”. Sformułowanie to w pełni odpowiada założeniom rozprawy, przy czym teza ta nie jest specjalnie oryginalna, gdyż analogiczne dla innych gatunków aplikacje opisano w przeglądzie literatury. **Cel pracy** został określony trafnie, choć nieco niezgrabnie. Użyto w nim sformułowania w czasie przeszłym („reakcja rośliny na stres związany z niedoborem określonego pierwiastka była określana za pomocą techniki fluorescencji chlorofilu”). Następnie w oddzielnym podrozdziale przedstawiono ogólny zakres pracy omawiający w sposób ogólny zastosowaną metodologię. Jest to niewątpliwie bardzo dobry pomysł, rzadko wykorzystywany w rozprawach doktorskich. **Material i metodyka** pracy zostały przedstawione w sposób szczegółowy i poza jednym wyjątkiem, o czym dalej, kompletny. W ramach pracy podjęto próbę wczesnego wykrycia niedoborów wybranych makroskładników (wapnia, azotu, fosforu i potasu) za pomocą pomiarów kinetyki indukcji sygnału fluorescencji chlorofilu „a” w liściach zaadaptowanych do ciemności i opracowania wyników tych pomiarów z pomocą testu OJIP oraz analizy przebiegu krzywych indukcji. Badania prowadzono w trzech kolejnych latach na roślinach miskanta uprawianych w układzie trwałego doświadczenia nawozowego, co uznać należy za niewątpliwą zaletę pracy. Pozwala to bowiem na bardziej bezpośrednie przełożenie wyników uzyskanych w pracy na rzeczywiste warunki uprawy. Zastosowano 6 kombinacji nawozowych (CaNPK, NPK, CaPK, CaPN, CaKN i Ca). Pomiary fluorescencji chlorofilu wykonywano w przedziałach około

10 dniowych na trzech poziomach łanu (warstwie górnej – liście nie w pełni wykształcone i młode), środkowej (liście w pełni dojrzałe) i dolnej (liście stare i degenerujące). Było to podejście słuszne, jednakże potencjalne nierozróżnianie liści niewykształconych od młodych oraz starych od degenerujących mogło być źródłem błędów przy nieodpowiednim zachowaniu rzeczywistych proporcji wymienionych grup liści podczas wykonywania pomiarów. Corocznie pod koniec wegetacji oceniano również plon biomasy. Przed rozpoczęciem badań zmierzono pH gleby i zawartość w niej: C, N, P, K i Ca. W drugim roku badań zbadano też dodatkowo poziom interesujących autora pierwiastków w liściach. Spośród parametrów fluorescencji chlorofilu „a” analizie poddano jedynie wybrane (fluorescencje minimalną i maksymalną, maksymalną wydajność kwantową fotoukładu drugiego (PSII), maksymalną efektywność rozszczepiania wody po donorowej stronie PSII i pole powierzchni nad krzywą indukcji fluorescencji chlorofilu). Analizowano też ogólne indeksy sprawności (PI) dla PSII (PI_{ABS}) oraz całego łańcucha transportu elektronów (PI_{total}). Brak w rozprawie wyjaśnienia dlaczego tylko te parametry były brane pod uwagę. Ponadto ani we wstępie, ani w opisie stosowanej metodyki nie opisano wspomnianych wyżej parametrów PI_{ABS} i PI_{total} oraz sposobu ich wyliczenia. Dla każdego punktu pomiarowego zaprezentowano też wykresy krzywych indukcji fluorescencji (bez normalizacji i po podwójnej normalizacji).

Parametry fluorescencji chlorofilu oraz dane dotyczące zawartości makroskładników w materiale roślinnym i wielkości plonu poddano prawidłowej analizie statystycznej z wykorzystaniem analizy wariancji oraz testu Tukey’a dla zbadania istotności różnic pomiędzy średnimi. Dane poddano też analizie składowych głównych (PCA). W przypadku tej analizy bardzo nierówna dystrybucja zmienności pomiędzy czynnik 1 i 2 (92,46% i 6,41%) czyni te wyniki średnio przydatnymi – jest to praktycznie analiza jednowymiarowa. Nie wiadomo też dlaczego autor opisał czynniki jako „reakcje pierwotne PSII” i „aktywność aparatu fotosyntetycznego (PSII + PSI)”. Odpowiednie wyniki, które mogłyby to uzasadniać nie zostały zaprezentowane. W Tabeli 7 przedstawiono „współczynniki korelacji”. Nie wiadomo jakie i nie wiadomo, czy były one statystycznie istotne. Brak też analiz statystycznych (choćby wyliczenia i zaprezentowania błędów standardowych) w przypadku porównywanych krzywych indukcji fluorescencji chlorofilu.

Wyniki prowadzonych badań przedstawiono i opisano w sposób systematyczny i czytelny na 45 stronach rozprawy. Prezentacja wyników objęła 24 ryciny i 11 tabel, przy czym część z nich umiejscowiono w rozdziale dyskusja, co nie jest zasadniczo poprawne. Wyjątkiem jest tu syntetyzująca wyniki doświadczeń Tabela 6.

W pracy stwierdzono, że niedobór któregośkolwiek z badanych makroskładników wyraźnie negatywnie wpływa na przebieg zależnej od światła fazy fotosyntezy. Niedobory badanych makroskładników powodowały nie tylko zmiany mierzonych parametrów fluorescencji chlorofilu, ale wpływały również na przebieg krzywych indukcji fluorescencji chlorofilu (nie do końca poprawnie nazwanych krzywymi testu OJIP, gdyż OJIP odnosi się jedynie do punktów charakterystyczne tych krzywych). Uzyskane wyniki wyraźnie sugerują, że zastosowanie pomiarów fluorescencji chlorofilu w diagnostyce niedoborów potasu i fosforu jest możliwe. Z drugiej strony nie da się tej metody w sposób jednoznaczny użyć do diagnozowania niedoborów azotu i wapnia.

Dyskusja jest niestety najslabiej napisaną częścią pracy. Liczy ona niespełna 12 stron włączając w to ryciny i tabele, na których pokazano, z wymienionym wcześniej wyjątkiem, kolejną porcję wyników. Wyniki te zostały również omówione w tym rozdziale co pozostawiło na właściwą dyskusję krytycznie porównującą uzyskane wyniki z pracami innych autorów, oraz omawiającą dalsze perspektywy ich wykorzystania około 3 strony. To za mało jak na dobrą rozprawę doktorską, choć trzeba przyznać, że to co zostało napisane jest logiczne i świadczy o właściwych kompetencjach Doktoranta. Odnieść można wrażenie, że Doktorantowi zabrakło czasu na rozbudowanie poruszonych w dyskusji wątków i mając świadomość szczupłości tego rozdziału przeniósł do niej końcową część rozdziału Wyniki.

W pracy sformułowano jedenaście wniosków. Wnioski te znajdują w większości oparcie w wynikach przedstawionych w rozprawie i są, również w większości, merytorycznie poprawne. Nie do końca jasny i dodatkowo niepoprawny językowo jest wniosek piąty w brzmieniu: „Warunki pogodowe mogły obok czynników doświadczalnych wpływać na mierzony sygnał fluorescencji chlorofilu i parametry pochodzące z fotoukładu II oraz te wyliczone z testu JIP, co w konsekwencji wpływa na wielkość końcowego plonu.” Wynika z niego, że zmieniający w związku ze zróżnicowanymi warunkami pogodowymi sygnał fluorescencji chlorofilu wpływa na wielkość plonu, co jest niepoprawnym uproszczeniem. Ten element wnioskowania obecny jest też w kolejnych wnioskach, szczególnie wyraźnie we wniosku ósmym, gdzie wprost wymienia się wartości dwóch wskaźniki fluorescencji jako niekorzystne dla plonowania.

We wniosku siódmym z kolei nie wiadomo o jakie „powyższe wskaźniki fluorescencji chlorofilu” chodzi, gdyż powyżej żadne wskaźniki nie zostały wymienione. Ponadto są w nim przytoczone wyniki, co nie powinno stanowić elementu wniosku.

Wnioski 9 i 10 oparte są na domniemaniach opartych o wiedzę specjalistyczną a nie na wynikach własnych. W rozprawie nie badano bowiem gospodarki wodnej roślin (wniosek 9),

ani transferu energii na poziomie organizmalnym (wniosek 10). W obydwu przypadkach niejasne jest też dlaczego Doktorant sądzi, że zaburzenia fizjologiczne prowadzą do maksymalizacji plonu. Nawet intuicyjnie jest dokładnie odwrotnie. Myślę, że problemem są tu nie błędy merytoryczne lecz niejasność sformułowań.

W pracy cytowanych jest 270 pozycji literatury. W zakresie zagadnień bezpośrednio związanych z treścią rozprawy nie pominięto żadnego istotnego materiału źródłowego, a sposób powoływania się na cytowane pozycje świadczy o dobrej znajomości ich przez Doktoranta.

Słabą stroną pracy jest jej strona redakcyjna. Zauważyć można wiele błędów, które powinny zostać na etapie redagowania pracy skorygowane. Są one zapewne wynikiem pośpiechu w końcowym etapie pracy nad rozprawą skutkującym m.in. wprowadzaniu poprawek nie do końca pasujących do otaczającego tekstu. Nie w pełni czytelne są też wykresy liniowe, inne niż te, przedstawiające krzywe indukcji fluorescencji chlorofilu. Zdecydowanie lepszym rozwiązaniem byłoby tu zastosowanie różnych kolorów zamiast różnych typów linii. Przytoczę tu jedynie błędy znalezione na pierwszych stronach pracy. Na stronie tytułowej błędnie określono, że rozprawa obejmuje zakres dyscypliny naukowej „rolnictwo”, gdyż taka dyscyplina obecnie nie istnieje. W 7-8 wierszu streszczenia nie napisano, że chodzi o liście. W przedostatnim wierszu streszczenia użyto słowa „możliwa” zamiast „możliwe”.

Podsumowując, dysertacja Pana Tomasza Horaczka stanowi samodzielne rozwiązanie problemu badawczego przy użyciu adekwatnej metodyki badań, co jest ustawowym wymaganiem stawianym rozprawom doktorskim. Stawiane w recenzji zarzuty dotyczą głównie warstwy językowej, redakcyjnej i prezentacji uzyskanych wyników. Nie podważają one jednak niewątpliwej wartości uzyskanych wyników i ogólnej poprawności ich interpretacji.

Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty przedstawionej mi do recenzji rozprawy stwierdzam, iż spełnia ona kryteria stawiane w Artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie Pana mgr inż. Tomasza Horaczka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Marcin Rapacz