

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Tomasza Horaczka pt.: „Reakcja aparatu fotosyntetycznego roślin miskanta olbrzymiego (*Miscanthus x giganteus* Anderss.) rosnących w warunkach niedoboru wybranych makroskładników w podłożu” wykonanej w Katedrze Fizjologii Roślin, Wydziału Rolnictwa i Biologii, SGGW.
Promotor pracy: dr hab. Mohamed Hazem Kalaji
Promotor pomocniczy: dr hab. Piotr Dąbrowski

Charakterystyka pracy

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr inż. Tomasza Horaczka dotyczy ważnego dla rolnictwa problemu określenia reakcji aparatu fotosyntetycznego roślin miskanta olbrzymiego uprawianych w warunkach polowych, w odpowiedzi na stres związany z niedoborem wapnia, azotu, fosforu i potasu, za pomocą techniki fluorescencji chlorofilu.

Miskant jest rośliną uprawianą na cele energetyczne, której biomasa charakteryzuje się wysoką wartością opałową. Biomasa miskanta może być wykorzystana na różne sposoby, w tym do celów opałowych czy do produkcji biogazu.

Rośliny rosnące w warunkach polowych podlegają wpływowi wielu stresów abiotycznych i biotycznych. Poznanie reakcji roślin uprawnych na działanie stresów, wśród których jednymi z najważniejszych są niedobory makroskładników, szczególnie w początkowej fazie stresu, pozwoliłoby na ewentualne podjęcie działań zapobiegawczych.

Praca doktorska posiada typowy układ rozpraw doktorskich, liczy 170 stron, 85 (86) rysunków i 8 tabel oraz zacytowano w niej łącznie 260 artykułów, materiałów internetowych i informacji ustnych.

Jedną trzecią pracy stanowi Przegląd literatury, który liczy 53 strony. Autor przedstawił w nim formy pobierania składników przez rośliny, bardzo obszernie wybrane mechanizmy pobierania składników pokarmowych przez rośliny, rolę wybranych do badań makroskładników w życiu rośliny, fluorescencję chlorofilu jako narzędzie do wykrywania stresów roślinnych, inne metody wykrywania niedoborów składników pokarmowych oraz charakterystykę miskanta olbrzymiego. Wydaje mi się, że niektóre aspekty Przeglądu literatury np. przedstawienie tak dokładnej charakterystyki transporterów błonowych każdego z badanych, deficytowych pierwiastków, mogłyby zostać pominięte albo przedstawione znacznie krócej, jako że nie są one dalej wykorzystywane za wyjątkiem ostatniego zdania Dyskusji „W tej sytuacji zachodzi potrzeba podjęcia badań nad ewentualną rolą wszystkich wymienionych wcześniej kanałów potasowych i transporterów jonów antagonistycznych w funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego miskanta w warunkach stresy mineralnego”.

Autor w latach 2015-2017 badał rośliny miskanta olbrzymiego, rosnące na 6 kombinacjach nawozowych (CaNPK, NPK, CaPK, CaPN, CaKN i Ca) na trwałym doświadczeniu nawozowym SGGW w Skierniewicach, prowadzonym od 1922 roku. W rozdziale „Metodyka” autor scharakteryzował układ eksperymentalny obejmujący te obiekty doświadczalne oraz przebieg temperatury i opadów w latach 2015-2017. Pomiary obejmowały 7 wybranych parametrów fluorescencji chlorofilu a, które zależnie od warunków pogodowych danego roku przeprowadzono w 6 – 15 terminach pomiaru, co około 10 dni, na trzech poziomach listowia łanu. Zbadano też zawartość badanych 4 makroskładników w glebie i pH gleby w dwóch latach. W drugim roku badań zbadano zawartość badanych

pierwiastków w liściach pochodzących z 6 pierwszych terminów. Dodatkowo na koniec każdego okresu wegetacyjnego określano plon biomasy miskanta. Autor dokładnie przedstawił jak dokonywano pomiarów fluorescencji chlorofilu, jak badano zawartość badanych makroskładników w liściach, jak określano zawartość badanych pierwiastków i pH w glebie, kiedy i jak wykonywano zbiór biomasy roślin oraz jak dokonano opracowania statystycznego wyników.

Autor w pełni zrealizował cel pracy i przedstawił reakcję aparatu fotosyntetycznego roślin miskanta na stres wywołany deficytem ww. makroskładników w każdym roku badań. Na podkreślenie zasługuje podjęta przez autora próba fizjologicznej interpretacji otrzymanych wyników pomiarowych oraz próba powiązania tych parametrów ze wzrostem miskanta. Podczas interpretacji otrzymanych danych autor wziął pod uwagę wpływ innych czynników takich jak np. warunki pogodowe na badane parametry fluorescencji. Stwierdził m.in., że deficyt badanych makroskładników objawiał się modyfikacją sygnałów pochodzących z fluorescencji chlorofilu i przebiegu krzywych OJIP, i że zastosowanie fluorescencji chlorofilu jest przydatne we wczesnej detekcji objawów niedoboru określonego makroskładnika, w szczególności potasu i fosforu. Stwierdził również, że wyższe wartości wskaźników funkcjonowania PSII w stosunku do pozostałych kombinacji mają największy wpływ (w roku o niskich i średnich opadach) na najlepiej plonującą z pozbawionych określonego makroskładnika kombinację CaKN. Ważnym podkreślenia jest też wniosek dotyczący wzrostu tej rośliny przy przeciętnym poziomie opadów, w którym autor stwierdził, że wzrost pola powierzchni nad krzywą OJIP i aktywności kompleksu odpowiedzialnego za rozszczepienie wody po donorowej stronie PSII, są niekorzystne dla plonowania zarówno przy pełnym nawożeniu jak i bez NPK.

Jednak wydaje się, że zaproponowana w pracy szybka i atrakcyjna metoda badania fluorescencji chlorofilu a, aby mogła szeroko służyć do badania deficytu tych 4 makroelementów, powinna zostać jeszcze bardziej dopracowana. Metoda ta jest wyjątkowo czuła i dlatego parametry fluorescencji są modyfikowane przez inne warunki środowiska, w tym przez warunki pogodowe i obserwowane zmiany w ich wielkości mogą pochodzić z różnych źródeł. Zresztą autor zdawał sobie z tego sprawę i sugerował, że chcąc zastosować fluorescencję chlorofilu w diagnostyce niedoboru określonego pierwiastka, oprócz zmierzenia określonych parametrów fizjologicznych, konieczne jest wykonanie oznaczeń zawartości określonych pierwiastków za pomocą referencyjnych metod. Autor przedstawił też współczynniki korelacji między zawartością każdego z badanych makroelementów, a wybranymi parametrami fluorescencji chlorofilu dla różnych kombinacji nawozowych miskanta olbrzymiego w roku o średnich opadach. Jednak żaden z parametrów nie tworzył istotnej zależności z zawartością wybranych makroskładników. Na podkreślenie zasługuje też próba autora dotycząca ulepszenia tej metody m.in. autor napisał, że wskazane jest przeanalizowanie współczynników nie tylko średnich, ale również z poszczególnych terminów pomiarowych

Uwagi krytyczne i polemiczne

- Praca charakteryzuje się dużą liczbą literówek np. zamiast Selerowców jest Selowców (str. 19) czy zamiast femtosekund jest fetmosekund (str. 41)
- Czy nie lepiej byłoby w tytule ująć fotoukład II zamiast cały aparat fotosyntetyczny?
- W Spisie treści do dwóch różnych podrozdziałów zastosowano tę samą numerację (2.4. str. 4)
- W Wykazie stosowanych skrótów i oznaczeń skróty nie zostały przedstawione alfabetycznie np. skróty na literę M są przedstawione między tymi na literę N i O czy te na

- Q są między tymi na litery S i T oraz występuje niekonsekwencja w stosowaniu tłumaczeń angielskich np. podano angielskie rozwinięcie ATP czy GTP, ale już nie NADPH czy PAR.
- Dlaczego w tab. 1 (zmodyfikowanej przez autora) z 17 niezbędnych pierwiastków dla roślin, nie licząc węgla, wodoru i tlenu, podano tylko 13 pierwiastków, można było chyba też podać ten 14-ty (str. 14)
 - W Przeglądzie literatury autor myli pojęcie liczości materii i stężenia np. „gdzie stężenie jest rzędu milimoli do cytoplazmy komórek spoczynkowych, w których to stężenie jest rzędu nanomoli” (str. 19) i dalej np. str. 26-29
 - Jest przy tym azot składnikiem wielu enzymów (str. 29). Czy autor mógłby podać przykłady enzymów roślinnych bez azotu?
 - Wytwarzanie wydzielin korzeniowych zawierających w swym składzie odpowiednie enzymy zawierające kwasy organiczne (Mitra 2015) (str. 30). W których wydzielanych enzymach znajdują się kwasy organiczne?
 - Pierwszy z nich (system transportowania fosforu) działa na zasadzie niskiego powinowactwa do jonów fosforanowych i optymalnie funkcjonuje, gdy wartość stałej Michaelisa –Mentena (Km) waha się od 6 do 8 mol (str. 32). Czy Km równe 8 mol/dm³ dla jonów fosforanowych może istnieć?
 - Metoda fluorescencji chlorofilu oparta jest na absorpcji promieniowania o dwóch określonych długościach fali 668 i 730 nm (str. 41), czy autor nie miał czasem na myśli emisji promieniowania przy tych długościach fali?
 - Govindjee (2002) uważa, że LHCI nie jest ufosforylowany w stanie II (przesunięcia polipeptydów z PSII do PSI) (str. 43), czy rzeczywiście tak jest?
 - Nie podano, że w drugim etapie przeprowadzenia podwójnej normalizacji odejmowano wartości dla kombinacji CaNPK, stąd wartości dla kombinacji CaNPK przyjmują wartość 0 i leżą na osi x-ów na rysunkach krzywych OJIP po podwójnej normalizacji (rys. 51b-80b, str. 109-131)
 - Dlaczego wzór wartość W po 100 μs symulowanej wykładniczej fluorescencji w badanej próbie, przy braku łączności między jednostkami PSII: $W_{E,100\mu s} = 1 - (1 - W_{300\mu s})^{1/5}$ (str. 53) różni się od analogicznych wzorów w innych pracach np. w cytowanej przez autora Kalaji i in. (2017) Chlorophyll Fluorescence: Understanding Crop Performance.
 - Wskaźnik SPAD wyraża się zatem wzorem: $SPAD = (940 \text{ nm} - 650 \text{ nm}) / (650 \text{ nm} - 940 \text{ nm})$ (str. 59). Czy rzeczywiście tak jest, bo jeśli byłoby to prawdą, to dla dowolnych wartości dla 650 i 940 nm zawsze otrzyma się wynik równy -1.
 - Wskaźnik NDVI definiowany jako iloraz różnicy i sumy ilości odbitego promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni i promieniowania czerwonego, wyraża się następującym wzorem: $NDVI = (R_{850} + R_{650}) / (R_{850} - R_{650})$ (str. 59), co jest prawdziwe?
 - Zależności te ujmuje wzór: $E_w = E_p - h\nu$ (str. 62), czy rzeczywiście atom w stanie wzbudzonym ma mniejszą energię niż w stanie podstawowym?
 - Zdaniem Greefa i Deutera (1993), większość przedstawicieli tego rodzaju pochodzi z terenów południowo wschodniej Azji, co potwierdza Rys. 27. (str. 67), chyba raczej rys. 26.
 - Na str. 79 napisano, że rok 2017 (trzeci rok badań) charakteryzował się najwyższą sumą opadów i był on przeszło dwukrotnie wyższy od tej stwierdzonej w roku 2015 (pierwszym roku badań), natomiast na rys. 28 (str. 80) pokazano, że opady w 2015 i 2017 wynosiły odpowiednio 423 i 820 mm.
 - Brak jednostek temperatury zarówno na rys. 28b (str. 79) jak i w podpisie do tego rysunku (str. 80).
 - Dlaczego pH i zawartość składników mineralnych podano za lata 2013 i 2015 (tab. 5 na str. 82-83)?
 - Dwa rysunki otrzymały numer 74 (str. 126 i str. 127 oraz str. 148)

- Jak można wytłumaczyć ujemną korelację między plonem a Fv/Fm, często zbliżoną do – 1, dla wielu kombinacji nawozowych (Tab. 7, str. 137)?
- Brak zacytowania rys. 84 w tekście (str. 138)
- Wykres punktowy (ang. scatter plot) (Rys. 87) wynikający z przeprowadzonej analizy wielowymiarowej, jest naprawdę Rys. 85 (str. 139)
- Dlaczego w pracy nie podano zawartości badanych makroelementów, chociaż w Tab. 8, podano średnie wartości współczynników korelacji między zawartością każdego z badanych makroelementów, a wybranymi parametrami fluorescencji chlorofilu dla różnych kombinacji nawozowych miskanta olbrzymiego w roku o średnich opadach (str. 142) oraz dlaczego korelacje dotyczą tylko 6 a nie wszystkich 7 badanych parametrów fluorescencji (dlaczego pominięto parametr Area)?

Podsumowanie i Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana praca jest oryginalnym rozwiązaniem problemu, który jest bardzo aktualny i został właściwie sformułowany przez doktoranta. W pracy przedstawione są interesujące wyniki badań. Praca jest napisana poprawnie, uwagi mają charakter dyskusyjny albo odnoszą się do drobnych potknięć, które są raczej nie do uniknięcia i głównie wystąpiły w Przeglądzie literatury. Autor wykazał się umiejętnością analizy wyników badań.

Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty rozprawy stwierdzam, iż mgr inż. Tomasz Horaczek zrealizował postawiony przez siebie cel pracy doktorskiej, a praca spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim zawarte w Art. 13.1 w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, z późniejszymi zmianami. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Technologiczno-Przyrodniczego o dopuszczenie mgr inż. Tomasza Horaczka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.