

Prof. dr hab. Piotr Stypiński

Katedra Agronomii

Wydział Rolnictwa Biologii

SGGW Warszawa

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Anny Fariaszewskiej pt. „The effect of drought stress on yield, physiological process and chemical composition on forage grasses of *Lolium*, *Festuca* and *Festulolium*”

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Anny Fariaszewskiej została wykonana zgodnie z decyzją Rady Naukowej IUNG-PIB w Puławach z dnia 2.07.2016 r i pismem Przewodniczącego Rady Naukowej z dnia 11.07.2016 Nr RN-116/2016

Praca doktorska została napisana w języku angielskim, liczy ogółem 138 stron, w tym 102 strony właściwego tekstu. Praca podzielona jest na siedem głównych rozdziałów (wstęp, hipotezy i cele badawcze, przegląd literatury, materiał i metody badań, wyniki, dyskusja oraz wnioski). Oceniana rozprawa kończy się jedenastoma wnioskami, następnie Autorka przedstawia obszerny, liczący 240 pozycji spis literatury. Układ i struktura pracy są zgodne z ogólnie przyjętymi zasadami pisania prac naukowych i już na wstępie warto podkreślić, że praca jest przygotowana bardzo starannie pod względem redakcyjnym, zawiera np. wykaz stosowanych w pracy skrótów, rysunków i tabel co bardzo ułatwia śledzenie tekstu rozprawy i analizę uzyskanych wyników. Należy jednak w tym miejscu stwierdzić, że wykaz skrótów nie obejmuje wszystkich skrótów i symboli stosowanych w pracy (np. brak w wykazie takich skrótów jak WEI, UAA, OECD, ABA, PSI, PSII, NADP, NADPH, CP, HI, WU, RWC, LEA, ROS, WMO) co na pewno jest pewnym uchybieniem redakcyjnym.

Wstęp, hipotezy robocze i cele badań

Wstęp pracy (4 strony) jest bardzo dobrym wprowadzeniem w istotę i znaczenie problemu suszy. Autorka nie tylko podaje konsekwencje niedoborów wody dla przyrody, rolnictwa i człowieka ale analizuje różne rodzaje suszy (str.14) i nawiązuje do odporności i wrażliwości wybranych gatunków traw pastewnych. Wstęp pracy prowadzi do sformułowania hipotez badawczych i celów pracy doktorskiej, które są według mnie określone prawidłowo i mają znaczenie nie tylko naukowe ale również praktyczne, np. możliwość wykorzystania w hodowli odmian traw o wyższej tolerancji na stres czy posługiwania się wskaźnikami fizjologicznymi w ocenie stresu suszy.

Przegląd literatury

Przegląd wykorzystanego piśmiennictwa liczy 8 stron, jest napisany treściwie i interesująco, może szkoda, że nie podzielono go na podrozdziały (choć taki „ukryty” podział znajdujemy w konstrukcji przeglądu i sekwencji poszczególnych akapitów). Wykorzystana w pracy literatura jest na ogół dobrze dobrana, koncentruje się głównie na najnowszych badaniach i porusza wiele aspektów związanych z reakcją roślin na stres suszy. Dużo miejsca Doktorantka poświęca roli pewnych wskaźników fizjologicznych w ocenie reakcji roślin na suszę, zwraca uwagę np. na znaną ale nie zawsze docenioną w badaniach rolę proliny i kwasów fenolowych. Dyskusyjne jest natomiast przywiązywanie tak dużej roli do flawonoidów, gdyż wzrost ich zawartości w warunkach suszy może być także uwarunkowany innymi czynnikami. Bardzo interesujący jest fragment dotyczący wpływu suszy na cechy jakościowe i wartość pastewną traw. Autorka podaje przykłady zarówno pozytywnego jak i negatywnego wpływu niedoboru wody na cechy jakościowe co tylko utwierdza czytelnika w przekonaniu, że nadal należy prowadzić kompleksowe badania na ten temat z wykorzystaniem nie tylko nowoczesnej aparatury ale także badań molekularnych i biochemicznych. W tym na pewno interesującym przeglądzie piśmiennictwa brakuje mi tylko prac, które poruszają problem reaktywacji roślin po stresie suszy, ma to istotne znaczenie praktyczne było zresztą również przedmiotem część badań prowadzonych przez Doktorantkę i należało oczekiwać, że Autorka zasygnalizuje ten problem w przeglądzie literatury.

Material i metody

Opracowanie poprawnej metodyki jest podstawą rzetelności prowadzonych badań i decyduje o przebiegu doświadczeń, ich wynikach i wnioskach końcowych. W przypadku recenzowanej pracy metodyka była szczególnie trudna bo obejmowała zarówno badania wazonowe prowadzone i IUNG_PIB w Puławach jak i polowe realizowane w Melle w Belgii. W obu doświadczeniach badano dokładnie te same gatunki i odmiany traw (po dwie odmiany *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum* *Festuca pratensis* i *Festuca arundinacea* oraz jedna odmiana *Festulolium Brauni*). Doświadczenia wazonowe zostały założone w 2013 w Puławach w hali wegetacyjnej zgodnie z powszechnie przyjętą techniką prowadzenia tego typu doświadczeń (wazony Mitscherlich'a napełnione po 9 kg gleby pobranej z pól ornych, dokładnie przebadanej pod względem właściwości chemicznych i fizycznych), zastosowano jednolite nawożenie we wszystkich 144 wazonach (warto podkreślić skalę prowadzonych badań, to świadczy o bardzo ambitnych planach ale także o ich pracochłonności i czasochłonności). Przyjęto interesujący schemat zróżnicowania wilgotności i zastosowania zmiennych modeli suszy w oparciu o oznaczanie polowej pojemności wodnej, co zostało bardzo przejrzyste

przedstawione w tekście pracy i na rys.4 (str 27). Metodyka badań wazonowych nie budzi żadnych wątpliwości, są one zaplanowane i zrealizowane bardzo starannie, można tylko postawić pytanie dlaczego realizowano je tylko jeden rok (2013) w przeciwieństwie do badań polowych prowadzonych w Belgii przez trzy lata.

Badania polowe prowadzone w latach 2013-2015 w ILVO w Melle w Belgii budzą pewne wątpliwości i wymagają dodatkowego wyjaśnienia w trakcie obrony. Można się domyślać, że w tych doświadczeniach stosowano dokładnie te same gatunki i odmiany traw jak w doświadczeniu wazonowym w Puławach (tak zresztą wynika z dalszej części pracy) ale w opisie metodyki należało to wyraźnie podkreślić. Nie bardzo wiadomo dlaczego zastosowano tak różne nawożenie w latach 2014 i 2015, nie tylko rozkład nawożenia był zupełnie inny ale np. ogólna ilość N/ha w roku 2015 wynosiła 297 kg a w roku 2014 tylko 260 kg. Mam wątpliwości odnośnie zastosowanego modelu suszy, w obu latach badań tzw. prowokowaną suszę zastosowano tylko w II odroście (przed trzecim pokosem) co oznacza, że w innych odrostach trudno mówić o efekcie suszy. Nie bardzo rozumiem czym się kierowano ustalając 20 % wilgotności – mało zrozumiałe W podpisie rysunku 8 (str.31) brakuje informacji czym się różni obiekt a i b. W pracy znajdujemy bardzo szczegółowe opisy pomiarów i badań fitochemicznych, procedury metodyczne są opisane w pełni prawidłowo, może robić wrażenie wyposażenie laboratoryjne i wykorzystanie nowoczesnych technik pomiarowych, świadczy to na pewno bardzo dobrze o wiedzy i umiejętnościach doktorantki (bardzo przejrzysty schemat zastosowanej procedury został przedstawiony na rys.11). Nie budzą wątpliwości stosowane w pracy metody oceny paszowych parametrów jakościowych oraz zastosowane narzędzia i metody statystyczne oraz syntetyczne przedstawienie warunków meteorologicznych w okresie trwania doświadczeń polowych.

WYNIKI

Rozdział „wyniki” liczy 60 stron (około 50 % całej pracy), jest logicznie podzielony na podrozdziały tzn. Autorka najpierw omawia wyniki badań wazonowych a potem eksperymentów polowych, co ze względu na różne warunki i inną metodykę wydaje się całkowicie uzasadnione. Wyniki prowadzonych badań przedstawione zostały bardzo dokładnie i szczegółowo (może nawet czasami za szczegółowo) ale generalnie są one bardzo dobrze udokumentowane i w pełni wiarygodne (nawet w sytuacji gdy odbiegają od powszechnie znanych z literatury).

Część badań dotycząca **doświadczeń wazonowych** wskazuje na udowodniony wpływ suszy na plony i parametry fizjologiczne badanych odmian, Niedobór wody wyraźnie obniżał plon

suchej masy wszystkich badanych gatunków i odmian z wyjątkiem *Festulolium brauni* (która jednak zareagowała na susze w III pokosie). Z kolei najbardziej wrażliwa na stres suszy była kostrzewa trzcinowa, co jest zgodne z rezultatami uzyskiwanymi przez innych autorów. Brakuje mi natomiast zestawienia całkowitych plonów rocznych uzyskanych z wszystkich badanych traw, rysunek 12 jest w tym przypadku mało przejrzysty i niedokładny. Parametry wymiany gazowej, intensywność fotosyntezy, współczynniki transpiracji współgrają z omawianymi wcześniej wynikami plonów (np. redukcja intensywności fotosyntezy czy obniżenie asymilacji w wyniku stresu suszy), ale trudny do wytłumaczenia jest fakt niskiej korelacji między intensywnością fotosyntezy a plonem suchej masy w II okresie, (susza przed II pokosem) –rys.14/str.44. Logiczna jest także tendencja obniżenia transpiracji w warunkach suszy, wyraźne obniżenie transpiracji powinno oznaczać większą odporność na suszę, ale nie do końca się to sprawdza w przypadku *Festulolium*. Wiąże się z tym przewodnictwo szparkowe, które obniżało się wraz ze stresem suszy (choć Autorka jest niekonsekwentna pisząc na stronie 47, że zjawisko to miało miejsce we wszystkich badanych odmianach i okresach, a dalej wyjaśnia, że nie dotyczyło to życicy trwałej i kostrzewy łąkowej, zwraca uwagę również bardzo wyraźna relacja między transpiracją i przewodnictwem szparkowym w I okresie i znacznie słabsza korelacja w okresie II a zwłaszcza III (rys.20 i 21) co wymaga chyba jakiegoś komentarza i próby wyjaśnienia ze strony Doktorantki.

Bardzo interesujące są badania nad fluorescencją chlorofilu. Uzyskane wyniki potwierdzają, możliwość zastosowania tego wskaźnika do oceny skutków suszy (a może nawet możliwość prognozowania suszy fizjologicznej). Ten fragment pracy można uznać na pewno za duże osiągnięcie naukowe, podobnie jak przedstawione w dalszej części pracy wyniki zawartości w trawach proliny, która istotnie wzrastała w miarę postępującego stresu suszy, zwłaszcza w III okresie badań., również zawartość kwasów fenolowych i flawonoidów zwiększała się w warunkach suszy. Myślę, że Autorka zbyt mało uwagi poświęciła jednak różnicom, które wystąpiły między badanymi odmianami i gatunkami (np. wysokie wartości flawonoidów i kwasów fenolowych w kostrzewie łąkowej i trzcinowej (tab,12 i 13) związane są według mnie przede wszystkim z cechami genetycznymi. Autorka bardzo szczegółowo omawia parametry jakościowe badanych traw (str 60-66), generalnie badania potwierdziły, że w warunkach suszy zmniejsza się zawartość NDF i ADF, białka surowego natomiast we wszystkich okresach suszy zwiększała się zawartość rozpuszczalnych węglowodanów (WSC), chociaż zależało to również od gatunku i odmiany, dotyczy to również strawności błon komórkowych i strawności materii organicznej. Badania nie potwierdziły aby warunki suszy zdecydowanie pogarszały strawność paszy, np. w III okresie badań dla wszystkich badanych

kombinacji strawność włókna i strawność substancji organicznej (OMD) były wyższe (średnio o 10 %) w warunkach suszy w porównaniu do roślin rosnących przy optymalnym uwilgotnieniu. Ciekawy jestem jak Doktorantka może skomentować to zjawisko bo wyniki te są interesujące ale chyba dość nieoczekiwane. Na końcu tego podrozdziału omawiającego badania wazonowe brakuje mi jakiegoś zdania podsumowującego ten etap badań.

Badania polowe prowadzone w latach 2013-2015 w Instytucie ILVO w Belgii prowadzone były, co warto podkreślić z wykorzystaniem tych samych gatunków i odmian co w eksperymencie wazonowym w Puławach. Ciekawe, że w 2014 roku susza nie wpłynęła istotnie na wyraźne obniżenie plonów (w przeciwieństwie do roku 2015). Parametry wymiany gazowej układały się podobnie jak w doświadczeniach wazonowych w Puławach, ale reakcja poszczególnych gatunków traw była trochę inna (stosunkowo niewielki spadek intensywności fotosyntezy i asymilacji CO₂ u kostrzewy trzcinowej, co świadczyłoby o wyższej odporności na suszę tej trawy). Nie jest to jednak w pełni zgodne z rezultatami efektywnego wykorzystania wody (WUE), które właśnie u kostrzewy trzcinowej w warunkach suszy było stosunkowo niskie. Nie rozumiem zdania na str 78 cyt. "Analizy regresji pokazują istotną pozytywną korelację między plony suchej masy a efektywnością wykorzystania wody", rysunek 40 przedstawia relację odwrotną). Dla wszystkich badanych odmian stwierdzono, że susza obniża wartości PI i Fv/Fm co potwierdziło się w analizach wpływu tych parametrów na intensywność fotosyntezy. Podobnie jak w doświadczeniach wazonowych badania polowe wykazały wyraźny, statystycznie udowodniony wpływ suszy na wzrost zawartości proliny w trawach, potwierdza to możliwości wykorzystania tego wskaźnika w badaniach nad suszę, interesujące jest czy Doktoranta widzi szansę wykorzystania oznaczeń proliny w hodowli odmian odpornych na okresowe niedobory wody. (dotyczy to również flawonoidów i kwasów fenolowych). Interesujących danych dostarczają wyniki wartości paszowe, okazuje się, że np. zawartość białka surowego może być wyższa w roślinach poddanych stresowi suszy, a strawność substancji organicznej i błon komórkowych też nie musi się obniżać w wyniku stresu suszy, oznacza to że jeżeli chodzi o parametry wartości paszowej traw badania fizjologiczne i biochemiczne nie zawsze dają jednoznaczne wyniki.

Dyskusja i wnioski

Dyskusja jest chyba najlepiej napisanym rozdziałem ocenianej pracy. Doktorantka konfrontuje własne wyniki z danymi z literatury, nie powtarza dosłownie wyników ale stara się wyjaśniać stwierdzone w badaniach zjawiska, nie unika sytuacji gdy uzyskane przez Nią wyniki niezupełnie zgadzają się z rezultatami na które powołują się inni Autorzy,

Doktorantka stara się łącznie omawiać wyniki badań polowych i wazonowych ale jednocześnie wskazuje na przyczyny różnic między tymi serami badań zwracając słusznie uwagę np. na kompleksowość czynników w badaniach polowych, rolę procesu wernalizacji, zupełnie inne warunki i rozwój systemów korzeniowych w doświadczeniach polowych w stosunku do badań wazonowych, W ten sposób ustosunkowuje się do różnic w odporności na susze np. *Festulolium* czy kostrzewy trzcinowej w badaniach polowych i wazonowych. Sporo miejsca w dyskusji Autorka poświęca porównywaniu gatunków i odmian zwracając między innymi uwagę na odmiany tetraploidalne, które najczęściej są bardziej tolerancyjne na stres suszy. W przeglądzie literatury brakowało mi odniesień do problemu odbudowywania biomasy roślin po okresach suszy (grass recovery). W dyskusji znajdujemy nawiązanie do tego problemu (str 102), W oparciu o badania własne Autorka stwierdza, że prawdopodobnie młode rośliny nie miały odpowiednio wysokiego poziomu reakcji obronnej i nie były w stanie zregenerować się po ustaniu stresu suszy i po ponownym deszczowaniu, straty w aparacie fotosyntetycznym i w systemie korzeniowym powstające na skutek suszy były zbyt duże aby rośliny w krótkim okresie czasu pozytywnie zareagowały na ponowne nawadnianie. Taka regeneracja jest jednak możliwa w kolejnym roku badań co potwierdziły doświadczenia w Belgii i co jest z cytowanymi przez Autorkę wynikami innych badań.

Większe problemy miała Doktorantka w części dyskusji poświęconej analizie wskaźników fizjologicznych. Słusznie przyznaje, że co prawda produktywność fotosyntezy obniża się w warunkach suszy (co wiąże się z transpiracją, przewodnictwem szparkowym itp.) ale już oznaczenia fluorescencji chlorofilu i stosunku F_v/F_m , zwłaszcza w badaniach polowych nie wykazały wyraźnych różnic między testowanymi gatunkami i odmianami. Okazuje się, że wyniki uzyskane przez różnych cytowanych w pracy też są często rozbieżne, a ich interpretacja jest trudna. Badania prowadzone w ramach ocenianej pracy bardzo wyraźnie potwierdziły natomiast korelacje między zawartością proliny a występowaniem niedoborów wody, co oznacza, że rośliny wytwarzają prolinę adaptując się do warunków stresu, zostało to również potwierdzone w wielu wcześniejszych badaniach. Wiele badań prowadzonych jest również na temat roli flawonoidów i kwasów fenolowych w roślinach i zachowania się tych związków w warunkach różnych stresów ale wyniki są dosyć rozbieżne i rozumiem, że w tym aspekcie trudno było również dokonać pełnej syntezy prowadzonych w ramach niniejszej pracy badań. Nie bardzo mogę się zgodzić ze stwierdzeniem Autorki (str. 108), że jest mało badań nad wpływem stresu suszy na cechy jakościowe traw pastewnych. Badań tych jest stosunkowo dużo, o czym świadczą chociażby materiały z wielu konferencji Europejskiej Federacji Łąkarskiej ale podobnie jak w badaniach Autorki wyniki często są niejednoznaczne,

a nawet sprzeczne. Najczęściej jednak w warunkach suszy następuje obniżenie zawartości NDF i ADF, czasami białka surowego tak jak wykazała w swoich badaniach Doktorantka ale nie zawsze uzyskuje się pogorszenie jakości traw w wyniku obniżenia strawności, natomiast słusznie zwraca uwagę na różnice między badanymi gatunkami i odmianami niezależnie od stresu suszy (znacznie lepsze wartości strawności dla życicy trwałej niż dla kostrzewy trzcinowej i życicy wielokwiatowej). W pełni zgadzam się z uwagą Autorki w podsumowaniu dyskusji, **ze wpływ suszy znacznie wyraźniej widać w kształtowaniu się parametrów fizjologicznych niż parametrów jakości i wartości pokarmowej** co tylko wskazuje na konieczność dalszych badań na ten temat.

Praca kończy się 11 wnioskami, wynikają one z badań, są logiczne ale można by się zastanowić nad ich redakcją i skróceniem zbyt długich zdań oraz nawiązaniu w bezpośredni sposób hipotezy i celów badawczych. Wydaje mi się np., że spokojnie można połączyć wniosek 6 i 7 i przeredagować wniosek 11, który w obecnym kształcie jest właściwie elementem dyskusji.

Przegląd literatury

Bibliografia recenzowanej pracy liczy 240 pozycji. Są to najczęściej publikacje drukowane w bardzo poważnych periodykach naukowych i co ważne prace aktualne, z reguły wydane w ostatnich latach. W spisie literatury najstarsza praca jest praca z 1960 roku (poz. 223) ale ponieważ jest to praca typowa metodyczna można się zgodzić na jej cytowanie. Znalazłem również kilka prac z lat osiemdziesiątych, ale w większości są to również cenne prace metodyczne lub problemowe. Mam natomiast dwa poważne zastrzeżenia do włączenia do przeglądu literatury niektórych prac oraz do technicznego opracowania spisu bibliografii. Po pierwsze zbyt dużo prac dotyczy innych gatunków roślin (zboża, kukurydza, groch, ryż, słonecznik, rumianek, buk, fasola, oliwki, kawa, soja, czosnek, cebula i wiele innych często bardzo egzotycznych – w sumie naliczyłem ponad 30 takich prac). Opieranie się na tej literaturze i jej cytowanie w tekście miałyby uzasadnienie gdyby to były kluczowe opracowania o charakterze metodycznym lub porównawczym, tak jednak w większości przypadków nie było. Druga uwaga dotyczy cytowania prac polskich, Autorka w spisie literatury podaje angielskie tytuły polskich prac w sytuacji gdy prace te były drukowane po polsku (niektóre z nich nawet nie miały streszczenia w języku angielskim) czego nie wolno robić, prowadzi to do fałszywego wrażenia, że w pracy wykorzystano wyłącznie literaturę anglojęzyczną.

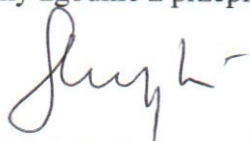
Należy jednak podkreślić dokładną redakcję zebranej literatury, nie znalazłem pracy, która byłaby cytowana w tekście pracy i nie została umieszczona w spisie literatury i odwrotnie.

Pod względem redakcyjnym spis literatury wykonany jest bardzo poprawnie i starannie, podobnie zresztą jak cała praca, którą czyta się z dużym zainteresowaniem, co świadczy o dużej łatwości pisania a także o bardzo dobrej znajomości języka angielskiego Pani mgr Fariaszewskiej.

Podsumowanie i wnioski końcowe

Praca potwierdza, że Autorka podjęła się ambitnego i trudnego zadania. Prowadzone na dużą skalę, wieloletnie badania terenowe w Belgii, wazonowe i laboratoryjne w IUNG-PIB w Puławach wymagały na pewno wiele wiedzy i umiejętności, a przede wszystkim były bardzo pracochłonne. Doktorantka uzyskała ciekawy i obszerny materiał wynikowy, z którego interpretacją miała trochę trudności, zwłaszcza, że analizy chemiczne parametrów jakościowych nie zawsze wskazywały na oczekiwane zróżnicowanie badanych odmian i gatunków, a złożone interakcje między badanymi czynnikami nie ułatwiały przejrzystego wnioskowania. Praca jest bardzo dobrze napisana w języku angielskim, błędy redakcyjne czy tzw. literówki zdarzają się naprawdę rzadko, niektóre takie błędy i uwagi (często o charakterze dyskusyjnym) wskazałem i naniósłem bezpośrednio w tekście. Pewne drobne usterki tej pracy nie przesłaniają jednak jej dużych wartości merytorycznych. Badania Autorki pozwalają na nowe spojrzenie na zachowanie wybranych odmian traw w warunkach suszy, co być może przyczyni się do postępu w hodowli nowych odmian odpornych na okresowe niedobory wody, co ma olbrzymie znaczenie nie tylko poznawcze ale także gospodarcze.

Reasumując uważam, że oceniana praca Pani mgr **Anny Fariaszewskiej** całkowicie spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję o dopuszczenie Autorki do publicznej obrony zgodnie z przepisami ustawy o tytule i stopniach naukowych.



Prof. dr hab. Piotr Stypiński

Warszawa 17.09.2016