

dr hab. Edyta Paczos-Grzęda, prof. uczelni  
Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin

Lublin, 12.09.2023 r.

**Wpłynęło dnia:**

**15. 09. 2023**

**Dziekanat Wydziału  
Biotechnologii i Ogrodnictwa URK**

## **RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**Pana mgr inż. Romana Erwina Bathelta**

**pt. „Ocena tolerancji mieszańców owsa z kukurydzą na stres suszy glebowej”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr inż. Romana Bathelta została zrealizowana pod kierunkiem promotora Pana dr hab. inż. Tomasza Warzechy, profesora URK w Katedrze Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego, Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie oraz pod kierunkiem promotora pomocniczego Pani dr hab. Marzeny Warchoł w Zakładzie Biotechnologii Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN w Krakowie. Rozprawa doktorska została wykonana w oparciu o fundusze Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie oraz częściowo w ramach projektu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju nr PBS3/B8/17/2015.

Głównym obiektem badań prowadzonych w niniejszej pracy doktorskiej jest owies zwyczajny (*Avena sativa* L.), zaś pobocznym kukurydza (*Zea mays* L.). Poszczególne gatunki należą odpowiednio do rodzajów *Avena* L. i *Zea* L., zaś oba rodzaje należą do rodziny *Poaceae* (wiechlinowate). Owies zwyczajny jest heksaploidem o ogromnym genomie (10,8 Gb) zawierającym w komórce haploidalnej 21 chromosomów przynależących do trzech subgenomów A, C i D. Podstawowa liczba chromosomów przypadająca na jeden subgenom wynosi siedem. Genom kukurydzy powstał najprawdopodobniej w efekcie diploidyzacji tetraploidalnego przodka, podstawowa liczba chromosomów w haploidalnym genomie wynosi 10, a wielkość genomu to ok. 2,2 Gb. Różnica w liczbie chromosomów wskazuje na istnienie dość znacznej bariery krzyżowalności między tymi dwoma gatunkami, jednak analiza syntenii genomów kukurydzy i innych roślin zbożowych wskazuje na pewne podobieństwo tych gatunków. Krzyżowania oddalone owsa z kukurydzą prowadzono szczególnie intensywnie w latach 90tych ubiegłego wieku, jako alternatywę dla nieskutecznej w owsie metody produkcji haploidów poprzez kultury pylników. Okazało się wówczas, że uprzednio wykastrowane, kwiaty owsa zapyłone pyłkiem kukurydzy są w stanie wykształcić haploidalne zarodki. Komórki rozwijającego się zarodka na wczesnym etapie embriogenezy stopniowo eliminują chromosomy kukurydzy, zdarza się jednak, że chromosomy te pozostają w komórkach. W kwiatach roślin F1 formują się niezredukowane gamety męskie i żeńskie, co zapewnia częściową samopłodność haploidów, jednak uzyskane w ten sposób potomstwo nie zawsze jest



euploidalne i stosunkowo często powstają aneuploidy o liczbie chromosomów owsa innej niż 42 oraz dodanymi, bądź nie, chromosomami kukurydzy. Właśnie tego typu linie były przedmiotem badań prowadzonych w recenzowanej pracy.

### Struktura pracy

Rozprawę doktorską mgr inż. Romana Bathelta stanowi monografia naukowa, która zawiera zarówno wyniki niepublikowane, jak i opublikowane przez autora w 2023 roku w formie artykułu naukowego pt. „Studies of oat-maize hybrids tolerance to soil drought stress” w czasopiśmie MDPI Agriculture (IF = 3,6 i 140 pkt MEiN). Monografia liczy 139 stron i obejmuje, poza stroną tytułową, informacją o finansowaniu badań oraz spisem treści następujące rozdziały: (1) Wykaz stosowanych skrótów, (2) Wstęp, (3) Przegląd literatury, (4) Cel pracy, (5) Materiał i metody, (6) Wyniki, (7) Dyskusję, (8) Podsumowanie i wnioski oraz (9) Spis literatury. W dysertacji wydzielono rozdziały typowe dla prac z zakresu nauk przyrodniczych jednak zaskakujący jest brak streszczenia rozprawy doktorskiej zarówno w języku polskim, jak i języku angielskim. Zazwyczaj te rozdziały pozwalają wstępnie zorientować się w tematyce pracy oraz uzyskanych wynikach, pozwalają też ocenić kandydata pod kątem jego umiejętności syntezy informacji oraz wyrażania treści naukowych w języku obcym.

Na początku rozprawy umieszczono Wstęp, który stanowi syntetyczne wprowadzenie w tematykę badawczą podjętą w pracy doktorskiej i sygnalizuje wszystkie istotne zagadnienia, których dotyczą prowadzone badania. W rozdziale tym opisano znaczenie gospodarcze owsa, czynniki powodujące pogorszenie jakości i ilości plonu, w tym niedobór wody, uargumentowano konieczność hodowli odmian tolerancyjnych na suszę. Omówiono zagadnienie homozygotyzacji materiałów hodowlanych, w kontekście haploidyzacji, podwojonych haploidów oraz krzyżowania z kukurydzą. Przedstawiono również możliwość wykorzystania mieszańców owsa z kukurydzą do polepszania odporności owsa na suszę, która mogłaby nastąpić w efekcie zwiększenia wydajności fotosyntezy lub ograniczenia transpiracji będących skutkiem ekspresji genów pochodzących z kukurydzy.

Przegląd literatury, będący trzecim rozdziałem ocenianej pracy liczy 25 stron. Autor w pięciu podrozdziałach omawia szczegółowo znaczenie gospodarcze owsa, znaczenie podwojonych haploidów w hodowli roślin, krzyżowanie oddalone, w tym wykrywanie mieszańców owsa z kukurydzą, oddziaływanie stresu suszy na produkcję roślinną oraz fizjologiczno-biochemiczne reakcje roślin na suszę. W ostatnim z podrozdziałów Autor opisuje test utraty wody i możliwości jego wykorzystania w identyfikacji roślin tolerancyjnych na suszę. Autor charakteryzuje zmiany jakie zachodzą w roślinach w następstwie niedoboru wody dotyczące zawartości cukrów rozpuszczalnych, białek, związków fenolowych i barwników fotosyntetycznych oraz kinetyki fluorescencji chlorofilu i na końcu wyjaśnia w jaki sposób wpływają one na fenotyp i plonowanie. Prezentowanym informacjom towarzyszy jedna tabela i sześć rycin.



W kolejnym rozdziale Autor przedstawia precyzyjnie sformułowany główny cel pracy, którego osiągnięcie wymagało realizacji pięciu celów szczegółowych.

Wykorzystany w pracy materiał oraz zastosowane metody zostały dość szczegółowo opisane w kolejnym rozdziale, zatytułowanym „Materiał i metody”, który obejmuje 14 stron i 9 podrozdziałów. W pierwszych podrozdziałach Autor opisuje metodykę molekularnej identyfikacji mieszańców zawierających chromosomy kukurydzy oraz oparte na analizie DNA mikrosatelitarnego przyporządkowywanie zidentyfikowanej w mieszańcach obcej chromatyny do konkretnych chromosomów kukurydzy. W kolejnych podrozdziałach przedstawia schematy doświadczeń szklarniowego i prowadzonego w tunelu oraz analizę parametrów biochemicznych i fluorescencji chlorofilu a. Następnie opisuje metodykę oceny wybranych elementów składowych plonu. W ostatnim podrozdziale prezentuje sposób prowadzenia analiz statystycznych uzyskanych wyników. Dodatkowo spis wykorzystanych materiałów, sekwencje starterów czy schematy doświadczeń przedstawiono w pięciu tabelach i dołączono dwa zdjęcia dokumentujące eksperyment szklarniowy i tunelowy.

Kolejny, liczący aż 64 strony, rozdział prezentuje wyniki i stanowi zasadniczą część pracy. W trzech podrozdziałach, zawierających 18 rycin i 44 tabele Autor opisuje przebieg i wyniki analiz molekularnych, a następnie wyniki eksperymentu szklarniowego i doświadczenia tunelowego. Otrzymane rezultaty są logicznie uporządkowane i czytelnie przedstawione.

W stanowiącej rozdział siódmy, liczącej 11 stron, „Dyskusji” Doktorant w sposób syntetyczny prezentuje interpretację uzyskanych wyników w oparciu o zgromadzoną literaturę. Pomimo, że w tej części nie wyodrębniono podrozdziałów Autor początkowo komentuje wyniki dotyczące testów molekularnych, a następnie poszczególnych analiz biochemicznych i fizjologicznych uzyskanych w obu przeprowadzonych eksperymentach, szklarniowym i tunelowym.

Pracę kończy „Spis literatury” obejmujący 141 pozycji piśmiennictwa, głównie angielskojęzycznych, z których niewiele ponad 20 opublikowano przed rokiem 2000, a większość w ciągu ostatnich 10 lat. Wykorzystany przez Autora zestaw publikacji niewątpliwie świadczy o jego bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym do prowadzenia działalności badawczej.

Podsumowując ocenę metodyczną rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że opracowano ją prawidłowo. Liczba błędów stylistycznych jest umiarkowana, zaś błędów interpunkcyjnych i edycyjnych znikoma, co świadczy o dużej staranności przygotowania manuskryptu.

#### Merytoryczna ocena pracy

Punktem wyjścia przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej były następujące założenia: (1) jednym z czynników ograniczających produktywność roślin jest stres suszy, (2) reakcja roślin na niedobory wody zależy od natężenia czynnika stresowego, genotypu i etapu rozwoju rośliny, (3) będące podwojonymi haploidami mieszańce uzyskane na drodze krzyżowań owsa z kukurydzą, u których wykryta zostanie chromatyna *Zea mays* L. mogą



charakteryzować się lepszą tolerancją na stres suszy glebowej z uwagi na liczne cechy kukurydzy warunkujące jej dużą zdolność adaptacji do warunków ograniczonego dostępu wody. W celu weryfikacji tych założeń sformułowano cel pracy, którym było zbadanie w warunkach suszy glebowej wybranych parametrów fizjologicznych, biochemicznych oraz agronomicznych powstałych na drodze krzyżowania oddalonego *A. sativa* z *Z. mays* linii mieszańcowych owsa (OMA) zawierających dodatkowo chromosomy kukurydzy, a następnie wytypowanie linii najlepiej przystosowanych do wzrostu i rozwoju w warunkach niedoboru wody. Osiągnięcie celu głównego wymagało realizacji celów szczegółowych: (1) identyfikacji mieszańców owsa z kukurydzą z zastosowaniem metod molekularnych, (2) detekcji poszczególnych chromosomów kukurydzy przy pomocy markerów SSR, (3) zbadania, w warunkach kontrolnych oraz suszy glebowej, wybranych parametrów fizjologicznych i biochemicznych mieszańców w warunkach szklarniowych, (4) oraz w tunelu wegetacyjnym, a także (5) określenia wybranych elementów plonu i produkcji biomasy w obu prowadzonych doświadczeniach oraz oszacowanie korelacji pomiędzy uzyskanymi danymi.

Badania wymagały od Autora opanowania wielu metodyk i ogromnego nakładu pracy, zarówno na etapie eksperymentów laboratoryjnych, jak i szklarniowo-tunelowych. W efekcie przeprowadzonych badań zgromadzono wyniki oceny kilkunastu parametrów fizjologicznych, biochemicznych i agronomicznych roślin OMA poddanych suszy glebowej. Analiza wariancji wykazała, że największy wpływ na uzyskiwane wyniki miał genotyp oraz traktowanie genotypu czynnikiem stresowym. W większości badanych linii pod wpływem stresu suszy nastąpiło istotne obniżenie parametrów fotosystemu PSII, zawartości barwników i pogorszenie cech związanych z plonowaniem. Wyniki wykazały, że tylko dwie linie OMA zachowały wysoki potencjał plonowania w warunkach stresu suszy w porównaniu z odmianą Bingo.

Za najważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Romana Bathelta uznają: (1) stwierdzenie w piętnastu badanych liniach OMA różnicowanego poziomu introgresji materiału genetycznego kukurydzy do genomu owsa, (2) wykazanie, zależnego od genotypu, istotnego wpływu suszy glebowej na kształtowanie się większości badanych parametrów biochemicznych i parametrów fluorescencji chlorofilu a w pierwszym i czternastym dniu suszy glebowej, zarówno w doświadczeniu szklarniowym, jak i tunelowym, (3) zaproponowanie pomiaru zawartości związków fenolowych w roślinach owsa w warunkach suszy, jako biochemicznego wskaźnika tolerancji tego gatunku na niedobór wody na podstawie obserwacji korelacji pomiędzy wysoką zawartością związków fenolowych a wysokim plonem ziarniaków w warunkach suszy, (4) identyfikację dwóch linii OMA nr 9 (D 109/10 × DC 2112/05 + chromosomy *Zea* 5 i 9) i nr 78b (Breton × Zolak 43/6 + chromosomy *Zea* 3, 8 i 9), możliwych do wykorzystania w dalszych pracach badawczych lub hodowlanych nad odpornością owsa na stres suszy glebowej. Linie te osiągały jako jedyne spośród analizowanych genotypów wyższe wartości badanych elementów składowych plonu od odmiany Bingo zarówno w kontroli, jak i w warunkach suszy glebowej. W linii OMA nr 9, wysokie wartości plonu związane były z małą utratą wody z liści, a więc największą spośród badanych linii



tolerancją tego genotypu na stres suszy. W przypadku linii OMA nr 78b, w warunkach suszy zaobserwowano redukcję masy pędów przy zachowaniu wysokiej liczby i masy ziarniaków.

W pracy uzyskano ogromną ilość wyników przedstawiających dużą wartość poznawczą i stanowiących punkt wyjścia do dalszych badań m.in. analizy ekspresji genów kukurydzy w liniach OMA czy stabilności przekazywania chromosomów kukurydzy w komórkach owsa w kolejnych pokoleniach. Jednocześnie, scharakteryzowane w pracy materiały, będą mogły być wykorzystane w dalszych pracach badawczych i hodowlanych nad owsem.

Z obowiązku recenzenta odnotowałam kilka uwag dotyczących rozprawy doktorskiej:

1. W „Przeglądzie literatury” przedstawiono systematykę rodzaju *Avena*, która właściwie nie jest już wykorzystywana. Obecnie stosuje się systematykę Bauma uaktualnioną przez Zellera oraz współczesnych autorów w oparciu o informacje uzyskane z molekularnych analiz porównawczych oraz sekwencjonowania genomów. Nie wyodrębnia się już wspomnianego przez Doktoranta gatunku *A. chinensis*, a do rodzaju należy ok. 30 gatunków di-, tetra- i heksaploidalnych, z których największe znaczenie gospodarcze ma *A. sativa* L. Uprawiane są głównie formy jare i oplewione tego gatunku. Formy nieoplewione (nagie) *A. sativa* mają mniejsze znaczenie. Do badań COBORU zgłoszono również w ostatnim czasie dwie odmiany owsa ozimego.
2. Pomimo, że przegląd jest bardzo obszerny i porusza wiele tematów to brakuje w nim informacji na temat uzyskiwania haploidów w owsie, dlaczego haploidalne rośliny F1 są płodne, jaka jest stabilność linii z dodanymi chromosomami kukurydzy w kolejnych pokoleniach, czy rośliny z jednej linii OMA są do siebie morfologicznie podobne, czy może dochodzić do crossing-over u mieszańców itd. Poruszane w pracy zagadnienia są na tyle skomplikowane, że warto byłoby je omówić bardziej szczegółowo. Odpowiedź na niemal każde z powyższych pytań wpływa na interpretację uzyskanych w pracy wyników.
3. Kolejna uwaga dotyczy materiału badawczego. Nie znalazłam informacji, z którego pokolenia roślin mieszańcowych pochodziły liście, z których izolowano DNA do badań molekularnych oraz czy potwierdzano obecność chromosomów bądź chromatyny kukurydzy w kolejnych pokoleniach? Ponadto na etapie molekularnej analizy obecności konkretnych chromosomów kukurydzy w komórkach mieszańców badano 14 spośród 15 linii wśród których zidentyfikowano obecność charakterystycznego dla kukurydzy retrotranspozonu *Grande 1*. W doświadczeniu szklarniowym i tunelowym również analizowano 14 linii, ale podczas gdy w analizach molekularnych pominięto linię nr 18, tak w doświadczeniu szklarniowym i tunelowym pominięto linię nr 97. Nie wyjaśniono co było przyczyną takiej zmiany, nie podano również w tekście pracy charakterystyki linii nr 18, czyli jakie chromosomy kukurydzy lub ich fragmenty zostały zidentyfikowane w tej linii.



4. Jeśli chodzi o metodykę mam również zastrzeżenia do przedstawienia ilości odczynników wykorzystywanych w reakcji PCR, a nie ich stężeń końcowych. Nie sprecyzowano też jakie były stężenia wyjściowe używanych odczynników: polimerazy, dNTP, magnezu czy starterów. Nie podano informacji o wielkości produktu amplifikowanego przy udziale pary starterów Grande. Nie znalazłam w pracy składu mieszaniny reakcyjnej do SSR. Uważam, że mikrosatelity jednak lepiej byłoby rozdzielać na poliakrylamidzie albo wysokorozdzielczej agarozie, gdyż identyfikacja obecności chromosomu nr 8 czy 10 jest niemal niemożliwa na podstawie załączonych zdjęć.
5. W metodyce nie podano również ile dokładnie roślin poddawano pomiarom w jednym powtórzeniu w eksperymencie szklarniowym i tunelowym. Ta liczba byłaby możliwa do obliczenia gdyby wiadomo było ile roślin rośło w jednym wazonie.
6. Nigdzie też nie spotkałam informacji na temat zróżnicowania morfologicznego między roślinami w obrębie linii OMA opisywanego przez innych autorów we wcześniejszych pracach na tego typu materiałach. Pewne wyobrażenie dają wartości odchylenia standardowego, niemniej jednak taka informacja byłaby pomocna w interpretacji wyników.
7. Uważam, że wyniki można było przedstawić nie tylko w formie tabel, ale również wykresów, tak jak to zrobiono w publikacji opracowanej na podstawie materiałów uzyskanych w pracy.
8. W rozdziale podsumowanie i wnioski, w pierwszym punkcie napisano, że „wśród 120 linii potwierdzono obecność 105 linii DH i 15 OMA”. W mojej opinii w pracy nie przedstawiono wyników potwierdzających/wykluczających status podwojonych haploidów u badanych roślin.
9. W prezentowanej pracy brakuje ostatecznie powiązania obecności dodatkowych chromosomów kukurydzy z obserwowanymi cechami. Nie wyciągnięto wniosków, które z chromosomów wprowadzają najbardziej pożądane zmiany. Nie przedyskutowano tego nawet w przypadku linii, które uznano za najlepsze. Chyba jest to najpoważniejszy zarzut odnośnie prezentowanej pracy, czyli brak oceny wpływu chromatyny pochodzącej z konkretnych chromosomów kukurydzy na fenotyp oraz parametry biochemiczne i fizjologiczne badanych roślin.

W trakcie obrony chciałabym usłyszeć od Doktoranta odpowiedzi na pytania, które sformułowałam w trakcie lektury recenzowanej pracy:

1. Z uwagi na to, że w pracy nie wyjaśniono w jaki sposób może dojść do intergacji fragmentów chromosomów kukurydzy z chromosomami owsa bardzo proszę o przedstawienie tej kwestii.
2. Na jakiej podstawie wybrano fazę wzrostu roślin, w której zastosowano czynnik stresowy w postaci suszy?
3. W jaki sposób uzyskano ziarniaki pokolenia F2 i F3 badane w niniejszej pracy?



4. Czy i w jakim kontekście poniższe stwierdzenia zawarte w pracy są prawdziwe „Uzyskuje się stabilną populację roślin z pokolenia F1 składająca się wyłącznie z homozygot reprezentującą wszystkie możliwe rekombinanty”, „W wyniku udanego krzyżowania powstaje pokolenie potomne składające się z pożądaných roślin haploidalnych” oraz „ruchome elementy genomu: retrotranspozony lub sekwencje telomeryczne”.

Przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską Pana mgr inż. Romana Bathelta oceniam pozytywnie. Uważam, że temat podjęty przez Doktoranta jest bardzo aktualny w świetle zachodzących zmian klimatu i coraz większego niedoboru wody w trakcie wegetacji roślin. Cele badawcze sformułowano w sposób jasny i prawidłowy. Dzięki zastosowaniu właściwych metod wytyczone cele zostały zrealizowane, a uzyskane wyniki i wnioski znajdują potwierdzenie w materiale dokumentacyjnym przedstawionym w tabelach i na rysunkach. Uzyskane przez Doktoranta wyniki mają znaczenie aplikacyjne i mogą w przyszłości wspomóc hodowlę nowych odmian owsa o zwiększonej tolerancji na suszę.

#### WNIOSEK KOŃCOWY

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr inż. Romana Bathelta pt. „Ocena tolerancji mieszańców owsa z kukurydzą na stres suszy glebowej” spełnia warunki określone w art.186 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742, z późn. zm.). Dysertacja Pana mgr inż. Romana Bathelta stanowi oryginalne, kompleksowe rozwiązanie problemu naukowego poszerzające aktualny stan wiedzy, prezentuje ogólną wiedzę Kandydata w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo oraz wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie o dopuszczenie Pana mgr inż. Romana Bathelta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Ewelina Pucos-Guzda*

Lublin, dnia 12 września 2023 roku

