

Prof. dr hab. Agnieszka Pszczółkowska

Olsztyn, dnia 27.08.2023 r.

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Katedra Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej

ul. Plac Łódzki 5, 10-727 Olsztyn

## **R E C E N Z J A**

**rozprawy doktorskiej mgr. inż. Anny Maciejewskiej-Hoza na temat:**

**„Zmienność wybranych cech użytkowych linii RILs łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.) oraz możliwości indukcji procesu haploidyzacji”**

**wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Renaty Galek, prof. uczelni.**

**Promotor pomocniczy dr hab. Bartosz Kozak.**

Łubin wąskolistny zaliczany jest do jednego z głównych gatunków rodzaju *Lupinus* uprawianych w Polsce i na świecie. Gatunek ten charakteryzuje się wysoką zawartością białka, tłuszczu oraz włókna w nasionach. Z tego względu znalazł zastosowanie w żywieniu ludzi, zwierząt oraz w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym. Nasiona tego gatunku mogą stanowić alternatywę dla białka pochodzącego z importowanej śruty sojowej wykorzystywanej w żywieniu zwierząt. Łubin wąskolistny wyróżnia się najkrótszym okresem wegetacji wśród uprawianych gatunków łubinów. Ze względu na symbiozę z bakteriami brodawkowymi łubin odgrywa istotną rolę w rolnictwie dzięki zdolności do wiązania azotu atmosferycznego, co wzbogaca glebę w związki azotowe niezbędne dla roślin. Dzięki pracom hodowlanym nad nowymi odmianami, które charakteryzują się odpornością na pęknięcie strąków i osypywanie nasion, obniżoną zawartością alkaloidów, zwiększoną odpornością na choroby (zwłaszcza antraknozę), termoneutralnością oraz zdeterminowanym typem wzrostu, gatunek ten zyskał na znaczeniu. Problemem pozostaje jednak niestabilność plonowania. Rozwiązaniem tego problemu mogą stać się nowoczesne narzędzia biotechnologiczne, takie jak markery molekularne i kultury *in vitro*.

Biorąc pod uwagę wyżej zasygnalizowane problemy badania podjęte przez mgr inż. Annę Maciejewską-Hoza nad zmiennością wybranych cech użytkowych linii RILs łubinu wąskolistnego oraz możliwości indukcji procesu haploidyzacji są w pełni uzasadnione. W tym kontekście problematyka badawcza jest interesująca i ważna z poznawczego oraz użytkowego

punktu widzenia dla hodowli roślin oraz współczesnego rolnictwa. Oceniana rozprawa liczy 177 stron maszynopisu, łącznie z wykazem skrótów; 39 tabelami; 27 wykresami; 14 zdjęciami; spisem tabel, wykresów i zdjęć oraz spisem literatury, w którym zamieszczono 198 pozycji. Układ pracy jest typowy dla dysertacji doktorskiej. Manuskrypt przedstawiono w 13 rozdziałach, uszeregowanych w następujący sposób: I. Streszczenie/ Abstrakt; II. Wstęp i cel badań; III. Stosowane skróty; IV. Przegląd literatury; V. Materiały i metody; VI. Omówienie wyników; VII. Dyskusja; VIII. Wnioski; IX. Bibliografia; X. Tabele; XI. Wykresy; XII. Zdjęcia; XIII. Spis tabel, wykresów i zdjęć. Tytuł został sformułowany poprawnie w stosunku do treści zawartych w pracy.

Rozprawa rozpoczyna się streszczeniem w j. polskim i angielskim, następnie dwu i półstronicowy „Wstęp i cel pracy”, w którym Autorka skupia się na aspektach znaczenia łubinu wąskolistnego, osiągnięciach i problemach prac hodowców, populacjach mapujących, wykorzystaniu kultur *in vitro* dla doskonalenia *L. angustifolius*, mikrorozmnażaniu, technice otrzymywania roślin haploidalnych, krzyżowaniu oddalonemu oraz androgenezie. W końcowej części tego rozdziału mgr inż. Anna Maciejewska-Hoza zapoznaje czytelnika z celami pracy oraz hipotezami badawczymi.

Autorka swoją pracę podzieliła na dwie części (polową i laboratoryjną) i w związku z tym zaproponowała dwa cele. Celem w pierwszej części pracy było przeprowadzenie charakterystyki zmienności nowej kolekcji linii RILs łubinu wąskolistnego pod względem cech morfologicznych oraz wybranych elementów struktury plonu, a także parametrów jakościowych nasion (zawartość białka i tłuszczu). Linie te otrzymano poprzez skrzyżowanie linii Lae-1 z ‘Emir’, co stanowi odwrotny układ krzyżowania w stosunku do populacji mapującej „ExL”. Populacje mapujące wyprowadzone ze skrzyżowania form rodzicielskich w obu kierunkach są przydatne do mapowania cech ilościowych [Kozak i in. 2019]. Do tego celu mgr inż. Anna Maciejewska-Hoza zamieściła komentarz, wskazując, że obie populacje mapujące reprezentują tło genetyczne polskiej hodowli. Populacja „LxE” została scharakteryzowana pod względem cech morfologicznych oraz elementów struktury plonu. Okazała się również przydatna do wygenerowania mapy genetycznej. W drugiej części pracy wykorzystane zostały cztery genotypy łubinu wąskolistnego (‘Emir’, ‘Graf’, ‘Karo’ i Lae-1), w celu zbadania możliwości otrzymywania roślin haploidalnych na drodze androgenezы oraz wykorzystania pyłku obcego - łubinu żółtego (500, 501 i Przebędowo) do krzyżowania oddalonego. Dla przyspieszenia

homozygotyzacji, jako alternatywną metodę zastosowano także technikę SSD, która pozwala na otrzymanie kilku pokoleń łubinu wąskolistnego w ciągu jednego roku.

Podkreślić należy, że zarówno cele pracy jak i hipotezy badawcze zostały poprawnie sformułowane, jednak w tym miejscu sędzę, że informacje dotyczące populacji mapujących zawarte w pierwszym celu powinny znaleźć się w metodyce.

Kolejny rozdział: „Stosowane skróty”, jest jak najbardziej zasadny i ułatwia czytelnikowi już na początku zapoznać się ze stosowaną nomenklaturą w dysertacji. Rozdział IV „Przegląd literatury” zamieszczony został na 15 stronach tekstu i podzielony na 5 podrozdziałów. Rozdział ten został dobrze napisany i udokumentowany piśmiennictwem krajowym i zagranicznym odnoszącym się do przedmiotu badań.

Przedmiot badań został zaprezentowany w rozdziale: „Materiał i metody”, który obejmuje 9 stron maszynopisu. Podstawą do opracowania pierwszej części pracy były badania polowe, zrealizowane w trzyletnim cyklu doświadczalnym (2016-2018), przeprowadzono w Stacji Hodowli Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, Oddział Przebędowo. Materiał do tej części badań stanowiły linie RILs łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.), pochodzące z kolekcji Katedry Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, który uzyskano ze skrzyżowania linii epigonalnej Lae-1 oraz odmiany Emir o tradycyjnym typie wzrostu w roku 2002, a następnie były poddane kilkuletniemu procesowi homozygotyzacji. W badaniach wykorzystano pokolenie F12. Podczas wegetacji określono barwę kwiatów oraz pokrój rośliny, natomiast pod koniec okresu wegetacyjnego przeprowadzono ocenę linii łubinu wąskolistnego pod względem wybranych cech morfologicznych i elementów struktury plonów oraz określono procentowy udział białka i tłuszczu w nasionach. W tej części pracy zostały scharakteryzowane warunki klimatyczne panujące podczas okresów wegetacyjnych oraz określono współczynnik hydrotermiczny Sielianinowa. Wyniki zostały przeanalizowane i opracowane statystycznie. Obliczono współczynniki korelacji, odziedziczalności oraz współczynnik zmienności, zastosowano również metodę analizy składowej cech głównych PCA (Principal Component Analysis).

Druga część pracy dotyczy badań laboratoryjnych: androgeneza, krzyżowanie oddalone oraz SSD. W celu pozyskania materiału do zaplanowanych doświadczeń wykorzystano nasiona czterech genotypów łubinu wąskolistnego: Lae-1, 'Karo', 'Emir', 'Graf', które wysiano zarówno

w polu (Rolniczy Zakład Doświadczalny, Swojec, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu) jak i w szklarni. W badaniach laboratoryjnych materiałem wykorzystanym do indukcji haploidów na drodze androgenezy były mikrospory, do krzyżowania oddalonego – zalążki, a do określenia możliwości otrzymania kilku pokoleń w ciągu roku techniką SSD (metoda pojedynczych nasion) - zarodki, czterech genotypów łubinu wąskolistnego. W pracach dotyczących oceny zdolności do androgenezy czterech genotypów łubinu wąskolistnego za pomocą kultur izolowanych mikrospor dokonano oceny stadium rozwojowego i żywotności mikrospor w pąkach kwiatowych oraz indukcji androgenezy w kulturach izolowanych mikrospor. Doświadczenia dotyczące krzyżowania oddalonego *L. angustifolius* x *L. luteus* zostały podzielone na dwa etapy. Pierwszy etapu dotyczył oceny zachowania się pyłku łubinu żółtego na znamionach *L. angustifolius*. Przepylono cztery genotypy *L. angustifolius* (Lae-1, 'Karo', 'Emir', 'Graf') z trzema genotypami *L. luteus* (500, 501, Przebądowo). Etap drugi dotyczył wpływu różnych podłoży na indukcję rozwoju zalążków uzyskanych w procesie krzyżowania oddalonego. W doświadczeniu dotyczącym uzyskania kilku pokoleń w ciągu jednego roku wykorzystano metodę pojedynczych nasion (SSD). W tych doświadczeniach opisano także warunki klimatyczne oraz wykonano analizy statystyczne.

Stwierdzam, że założenia metodyczne oraz opis wykorzystanych metod są poprawne. Jednak w tym miejscu nasuwają mi się pewne uwagi i spostrzeżenia, które mogą zostać wykorzystane przy redagowaniu pracy do druku:

- w opisie warunków prowadzenia doświadczenia polowego (str. 23) dobrze byłoby zawrzeć informacje o nawożeniu łubinu wąskolistnego;

- w opisie materiału badawczego w doświadczeniu polowym zabrakło informacji o liczbie linii łubinu wąskolistnego wykorzystanych do badań, ta informacja została podana dopiero w wynikach badań;

- w opisie dotyczącym pozyskania materiału do badań: androgeneza, krzyżowanie oddalone oraz technika SSD (str. 35) brakuje informacji o lokalizacji doświadczenia zrealizowanego w polu i w szklarni;

- na str. 38, trzeci wers od góry, wkradł się błąd, słowo strąki należy zamienić na „słupki”;

- w tabeli 5, w pierwszym wierszu proponuję zamienić: „ilość przepylanych kwiatów/słupków” na „liczbę ...”.

Rozdział „Omówienie wyników” został przez Autorkę opisany na 12 stronach maszynopisu i poparty wynikami przeanalizowanych badań zestawionymi w 28 tabelach, 22 wykresami oraz 14 zdjęciami. Tabele i wykresy zostały przedstawione w przejrzysty sposób co ułatwia czytelnikowi interpretację wyników. Doktorantka ten rozdział podzieliła na 3 podrozdziały. W pierwszym podrozdziale Autorka oceniła zmienność fenotypową linii RILs łubinu wąskolistnego pod względem użytkowym. Wykazała między innymi, że badane linie łubinu wąskolistnego w trzyletnim cyklu badawczym plonowały średnio od 0,2 do 1,1 kg z poletka (średnio 0,6 kg z poletka), a współczynnik zmienności dla tej cechy wyniósł 22%. Wykazała również, że spośród 108 linii łubinu wąskolistnego 6% genotypów miała zawartość białka poniżej 30%, a tylko dwie linie miały go powyżej 35%. Współczynnik zmienności oznaczony dla badanej cechy wyniósł 4,8%. Przeprowadzona przez Autorkę analiza składowych głównych (PCA) pozwoliła na wyodrębnienie istotnych dwóch pierwszych składowych, które wyjaśniały 74,7% zmienności. Pierwsza składowa główna odpowiadała za 45,06 % zmienności, natomiast druga za 29,61%. Największy udział w tworzeniu pierwszej składowej miały wysokość pędu głównego oraz wysokość całej rośliny. W drugiej: wysokość całej rośliny oraz masa tysiąca nasion. W analizie składowych głównych wyodrębniono również trzy klastry, w których wykazano duże zróżnicowanie między grupami pod względem badanych cech. W klastrze pierwszym i drugim przeważały genotypy o tradycyjnym typie wzrostu, natomiast w klastrze trzecim ponad 97% stanowiły rośliny epigonalne. W przypadku plonu oraz masy tysiąca nasion, średnia wartość była na zbliżonym poziomie. W drugim podrozdziale mgr inż. Anna Maciejewska-Hoza zbadała możliwość skrócenia procesu homozygotyzacji u łubinu wąskolistnego na drodze indukcji haploidów oraz zastosowania techniki SSD. W pracach nad krzyżowaniem oddalonym gatunków *L. angustifolius* x *L. luteus* do indukcji haploidów, dokonała oceny zachowania pyłków. Stwierdziła, że największy udział znamion z osadzonym pyłkiem stwierdzono dla odmiany Karo. Natomiast w przypadku zastosowanych przepylaczy najlepsze efekty uzyskano u odmiany Emir stosując przepylacz 500 i 501, u odmiany Graf najlepszy był pyłek *L. luteus* Przebédowo, u Karo najlepszy był *L. luteus* 501 oraz Przebédowo, a u linii Lae-1 przepylacz *L. luteus* 500. Analiza wszystkich układów krzyżowań wykazała, że dla genotypu Lae-1 najlepszą formą zapylającą był *L. luteus* Przebédowo. W tym wariacie stwierdzono najwyższe średnie procentowe wartości dla następujących parametrów: procent znamion z kielkującym pyłkiem (80%), procent wrastających łagiewek przez słupek (80%).

Kolejne prace dotyczyły oceny histologicznej rozwoju woreczka zalążkowego u odmiany Karo pod wpływem trzech donarów *L. luteus*. Autorka wykazała, że w układzie krzyżowania Karo x *L. luteus* Przebędowo po 48 godzinach od przepylenia stwierdzono podziały komórkowe, po 96 w woreczku zalążkowym zaobserwowano struktury wielokomórkowe, a po 168 godzinach wykształcający się zarodek. W badaniach analizowano także wpływ różnych podłoży hodowlanych na indukcje rozwoju zalążków w kulturach *in vitro*. W wyniku krzyżowania *L. angustifolius* x *L. luteus* wykazano istotny wpływ pożywek na procentowy udział zalążków ze zmianami jedynie w pierwszym terminie obserwacji (po 7 dniach), a najlepszy efekt uzyskano na podłożu P1\_B5+AC. W badaniach Doktorantka dokonała także oceny zdolności czterech genotypów *L. angustifolius* za pomocą kultur izolowanych mikrospor do androgenyzy. Wykazała, że genotypy łubinu wąskolistnego, typ pożywki oraz termin mają wpływ na rozwój mikrospor wykorzystywanych do tego procesu.

Do badań dotyczących uzyskania kilku pokoleń łubinu wąskolistnego w oparciu o metodę pojedynczych nasion – SSD, pobrano zarodki zygotyczne po 14 i po 28 dniach po kwitnieniu. Wykazano, że zarodki, prowadzone w kulturach *in vitro* na różnych podłożach, pobrane po 14 dniach od kwitnienia charakteryzowały się słabym wzrostem, a z czas zamarły. Natomiast zarodki pobrane po 28 dniach po kwitnieniu charakteryzowały się szybkim wzrostem, dlatego już po 7 dniach zostały przepasażowane i po 28 dniach zostały przeniesione do aklimatyzacji, a następnie wysadzone w polu. W warunkach polowych linia Lea-1, charakteryzowała się słabym wzrostem oraz brakiem kwitnienia, natomiast odmiany Karo, Graf i Emir dobrze się rozwijały i wykształciły strąki. Ze strąków wyrostłych roślin ponownie pobrano zarodki (28 dni po kwitnieniu) i analizy powtórzono. Ostatecznie podjęto się próby aklimatyzacji odmian Karo i Gryf w celu uzyskania kolejnego pokolenia (proces został przedstawiony na Zdjęciach 8-12).

Przy redagowaniu pracy do druku proponuję zamienić: „wykres” na „rysunek” oraz „zdjęcie” na „fotografia”, w celu dostosowania nomenklatury do ogólnie przyjętych standardów w publikacjach naukowych.

W mojej opinii opracowane przez mgr inż. Annę Maciejewską-Hoza wyniki badań własnych zaprezentowano szczegółowo i przejrzysto w formie zestawień tabelarycznych wraz z dobrym opracowaniem statystycznym. Bardzo szeroki zakres badań oraz dobrze przemyślana i dobrana metodyka dały Autorce duże możliwości do interpretacji uzyskanych wyników.

W rozdziale „Dyskusja” Autorka skonfrontowała wyniki badań własnych z piśmiennictwem krajowym i zagranicznym. W recenzowanej pracy dyskusja wyników jest również rozszerzoną interpretacją własnych wyników badań, co oceniam wysoko. Rozdział ten jest dobrze napisany, w logicznym układzie, poprawnym językiem, czyta się go dobrze mimo, że poruszane są często kwestie specjalistyczne.

Na podstawie wykonanych badań mgr inż. Anna Maciejewska-Hoza sformułowała 8 wniosków, które znajdują potwierdzenie w uzyskanych wynikach badań. Za najważniejsze uważam:

- Zmienność w kolekcji RILs stwierdzona dla takich cech jak: liczba strąków na pędzie głównym, liczba zawiązanych strąków na pędzie głównym i na pędzie bocznym będzie przydatna w dalszych pracach genetyczno- hodowlanych.
- Spośród wszystkich badanych genotypów pochodzących z populacji “LxE” wytypowano linie, które mogłyby być przydatne dla hodowli- 332, 268, 324 oraz 333. Linie te odznaczały się wysoką zawartością białka i tłuszczu oraz liczbą zawiązanych strąków na pędzie głównym.
- Zastosowana metoda pojedynczych nasion (SSD) pozwoliła na uzyskanie 3 pokoleń w ciągu jednego roku i może być alternatywą w uzyskaniu w krótszym czasie linii homozygotycznych.

Po rozdziale „Wnioski” Autorka zamieścił rozdział „Bibliografia”, który obejmuje 198 pozycji literatury wykorzystanych w niniejszej pracy, co świadczy o dobrej orientacji Doktorantki w obszarze poruszanych tematów. Jednak przy tak licznej literaturze Autorka nie ustrzegła się niedociągnięć. Nie wszystkie pozycje literatury zacytowane w tekście pracy znajdują się w spisie literatury brak np.: Lampart-Szczapa (2017); nie wszystkie pozycje literatury zostały zacytowane w tekście np.: Jezierny i in. (2010), Khan i in. (2012), Mahato i Chaudhary (2015), Marcinkowska i in. (2013), Niszczota i in. (1019), Nowakowska i in. (2015), Płaza i in. (2017), You i in. (2005). Występują także rozbieżności w tekście i spisie literatury dotyczące autorów i roku publikacji. Należy także zweryfikować i ujednolicić cytowanie pozycji wydanych przez COBORU. Autorka nie ustrzegła się także drobnych ale licznych błędów literowych, gramatycznych i stylistycznych, co zaznaczyłam w tekście pracy.

Przedstawiona do recenzji praca posiada walory poznawcze i użytkarne, charakteryzuje się ogromem wniesionej pracy, została poprawnie przygotowana w oparciu o analizowany materiał badawczy oraz analizy polowe i laboratoryjne. Treść pracy i przeprowadzone badania pogłębiają dotychczasową wiedzę z zakresu prac hodowlanych nad łubinem wąskolistnym i wnoszą wskazania do hodowli. Poczynione uwagi nie mają wpływu na wartość merytoryczną pracy, która jest pozytywna. Biorąc pod uwagę walory naukowe rozprawy stwierdzam, że jest ona świadectwem dojrzałości naukowej Kandydatki do stopnia doktora.

### **Wniosek końcowy**

**Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Anny Maciejewskiej-Hoza pt. „Zmienność wybranych cech użytkowych linii RILs łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.) oraz możliwości indukcji procesu haploidyacji” spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim z dziedziny nauk rolniczych, dyscyplina rolnictwo i ogrodnictwo, na podstawie art. 179 ust. 1 i 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669) w związku z art. 14 ust 2. Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. 2017 poz. 1789).**

**Stawiam zatem wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Anny Maciejewskiej-Hoza do dalszych etapów postępowania doktorskiego.**

Recenzent



Prof. dr hab. Agnieszka Pszczółkowska