



Rzeszów, 2023-08-24

Prof. dr hab. inż. Mirosław Tyrka  
Katedra Biotechnologii i Bioinformatyki  
E-mail: mtyrka@prz.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Maciejewskiej-Hoza pt. „Zmienność wybranych cech użytkowych linii RILs łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.) oraz możliwości indukcji procesu haploidyacji”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, na Wydziale Przyrodniczo-Technologicznym Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod kierunkiem dr hab. inż. Renaty Galek, prof. Uczelni oraz promotora pomocniczego dr inż. Bartosza Kozaka. Praca ma formę monografii, zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, spis treści, tabel, wykresów i zdjęć oraz objaśnienia skrótów. Kolejność rozdziałów jest typowa dla prac badawczych. Tytuł właściwie oddaje treść pracy, chociaż można rozważyć użycie terminu „linii rekombinacyjnych” zamiast „linii RILs”.

We wstępie krótko przedstawiono znaczenie łubinu wąskolistnego oraz jego rolę w żywieniu człowieka i zwierząt hodowlanych. Sprecyzowano główne cele hodowli łubinu i przybliżono dotychczasowe osiągnięcia w zakresie poprawy tolerancji na antraknozę i uzyskanie form niskoalkaloidowych o niepekających strąkach. Podsumowano również obecny status wykorzystania markerów molekularnych dostępnych do wspomagania selekcji, informacje o genach związanych z plonowaniem i zawartością alkaloidów oraz dotychczasowe prace z zakresu mapowania genetycznego i identyfikacji loci cech ilościowych (QTL). Wskazano na brak szybkich metod homozygotyzacji łubinu wąskolistnego. Nie uniknięto przy tym skrótów myślowych np. „Na otrzymanie cech użytkowych potrzeba kilkunastu lat”. Opracowanie efektywnych metod uzyskiwania podwojonych haploidów łubinu, bazujących na androgenezie, gynonenezie lub krzyżowaniach oddalonych, przyczyniłoby się do usprawnienia procesu hodowli. Wstęp kończą 3 hipotezy badawcze odpowiadające trzem częściom doświadczalnym pracy.

Rozdział „Przegląd literatury” zawiera uporządkowane informacje na temat systematyki łubinu z uwzględnieniem podziału na odmiany botaniczne i zmienności morfologicznej. Omówiono czynniki



kształtujące pokrój i morfologię roślin, w tym typy wzrostu oraz znaczenie gęstości siewu dla wylegania. W kolejnym podrozdziale przedstawiono wybrane zastosowania łąbinu, zakres pochodzenia i występowania oraz znaczenie gospodarcze wybranych gatunków. Kolejny podrozdział poświęcono omówieniu znaczenia i właściwości łąbinu wąskolistnego. Gatunek ten ze względu na swoje zdolności adaptacyjne i wykorzystanie do celów paszowych jest ważny w Polsce, co przekłada się na wysoką pozycję w rankingach, powierzchnię upraw i liczbę zarejestrowanych odmian. łąbin jest dobrym przedplonem ze względu na właściwości fitosanitarne, zdolności do symbiotycznego wiązania azotu oraz korzystny wpływ na strukturę gleby i przyswajalność innych pierwiastków. Ze względu na właściwości odżywcze, słodkie odmiany łąbinu wąskolistnego mogą stanowić ważny wysokobiałkowy składnik pasz dla krów mlecznych, świń i drobiu. U człowieka łąbin można traktować jako żywność funkcjonalną o właściwościach prozdrowotnych u osób z chorobami układu krążenia lub z cukrzycą.

W kolejnym podrozdziale przeglądu literatury przedstawiono kierunki hodowli łąbinu wąskolistnego. Celem głównym jest poprawa stabilności plonowania oraz zwiększenie tolerancji na stresy biotyczne i abiotyczne. Postęp biologiczny prowadzący do wzrostu plonowania był możliwy dzięki wprowadzeniu form samokończących, oraz redukcji osypywania nasion poprzez wyeliminowanie samoczynnego pęknięcia strąków. W zakresie stabilności plonu łąbin wąskolistny wymaga prac w kierunku zwiększenia tolerancji na stres suszy oraz odporności na choroby, szczególnie antraknozę i fuzaryjne wędnięcie łąbinów. Jak można wyjaśnić różnice w tolerancji na stres, potomstwa roślin rosnących w warunkach różniących się obecnością stresu.

W ostatnim podrozdziale przeglądu literatury przedstawiono zagadnienia z zakresu wykorzystania kultur *in vitro* w rodzaju *Lupinus* podzielone tematycznie na 4 części dotyczące mikrorozmnażania, krzyżowań oddalonych, tworzenia haploidów i androgenezy. Przedstawiono aktualny stan wiedzy w zakresie indukcji organogenezy za pośrednictwem kalusa z różnych eksplantatów oraz mikrorozmnażania u kilku gatunków łąbinu. Pierwszy podrozdział kończy opis udanych doświadczeń nad uzyskiwaniem mieszańców międzygatunkowych dzięki ratowaniu zarodków. W dalszej części przybliżono znaczenie krzyżowań oddalonych z powodzeniem wykorzystywanych w hodowli łąbinu. Przedstawiono różnego typu bariery pre- i postzygotyczne, oraz metody ich przezwyciężania. Z jednej strony krzyżowania oddalone mogą służyć poszerzeniu zmienności poprzez indukcję translokacji lub tworzenie amfiploidów a z drugiej strony mogą służyć do stymulacji rozwoju komórek haploidalnych z całkowitą eliminacją ojcowskiego materiału genetycznego. W podrozdziale dotyczącym technik



otrzymywania roślin haploidalnych przybliżono znaczenie praktycznego wykorzystania podwojonych haploidów w hodowli i omówiono metody bazujące na indukcji partenogenezy, oraz gynogenezy poprzez krzyżowania oddalone z uwzględnieniem podwajania liczby chromosomów. Odrębny podrozdział poświęcono androgenecie w rodzaju *Lupinus*. Opisano aspekty metodyczne procesu indukcji uzyskiwania haploidów z kultur pylnikowych i izolowanych mikrospor, znaczenie czynników chemicznych, fizycznych, genotypu i fazy rozwojowej mikrospor. Cennym uzupełnieniem części przeglądowej są syntetyczne zestawienia zawierające opis doświadczeń z zakresu mikrorozmnażania i androgenety w rodzaju *Lupinus*.

Materiały i metodykę przedstawiono oddzielnie dla doświadczenia polowego i laboratoryjnego. W pierwszej części, przy omawianiu zaawansowanych linii rekombinacyjnych zabrakło informacji o ich liczbie. Podano szczegóły agrotechniczne i doświadczalne przeprowadzonego doświadczenia. Populację scharakteryzowano pod względem barwy kwiatów, nasion, cech dotyczących pokroju, oraz cech związanych z plonem i jego jakością. Obliczono współczynnik hydrotermiczny Sielianinowa w czasie wegetacji a dane klimatyczne przedstawiono na wykresach i w tabelach. Przedstawiono wykorzystany model statystyczny, ale przy opisie analizy statystycznej brakuje nazwy pakietu statystycznego wykorzystanego do analizy w środowisku R.

Badania do drugiej części pracy obejmujące androgenetę, krzyżowania oddalone i SSD wykonano odpowiednio na mikrosporach, zalążkach i zarodkach czterech odmian łubinu wąskolistnego. O ile wykorzystanie Lae-1 i 'Emir' jest zgodne z zestawem RIL, to wybór odmian 'Karo' i 'Graf' wymaga uzasadnienia. Przedstawiono procedury oceny stadium rozwojowego i żywotności mikrospor oraz androgenety wykorzystane do doświadczeniu (Tabela 7). Odnośnie krzyżowań oddalonych, doświadczenie przeprowadzono wg planu zawartego w tabeli 9 wykorzystując różne składy pożywki do pobudzenia rozwoju zalągni. Opis procedury przygotowania preparatów trwałych odwołuje się do tabeli 8, która zawiera listę roztworów stosowanych w trzech etapach przygotowania preparatów. Nie jest jasne, który z tych roztworów wykorzystano, jak długo i w jakiej temperaturze. Określono również osadzanie i kiełkowanie pyłku na znamieniu *L. angustifolius*. Rozdział zawiera również pełen opis metody pojedynczych nasion (SSD) przeprowadzonej według schematu z tabeli 10 wraz z opisem warunków klimatycznych i analizy statystycznej. Numeracja tabel powinna być dostosowana do kolejności pojawiania się w tekście. Skala osadzania pyłku może powinna być bardziej precyzyjna.

Pierwsza część omówienia wyników zawiera ocenę zmienności fenotypowej RIL. Zidentyfikowano istotne współczynniki korelacji pomiędzy wybranymi cechami oraz określono odziedziczalność. Dla



cechy o najwyższych wartościach odziedziczalności jest największa szansa na identyfikację QTL. Uzupełnienia może wymagać metoda liczenia odziedziczalności. Brakuje omówienia wyników dotyczących barwy kwiatów, nasion i pokroju roślin z tabeli 3. U części roślin występują równocześnie białe kwiaty i nasiona lub różowe kwiaty i szare nasiona - jak wyjaśnić występowanie form kwitnących na niebiesko lub o innej kombinacji barw kwiatów i nasion. Na wykresach 3-15 przedstawiono frekwencję występowania linii w różnych przedziałach i wydaje się, że dobrze byłoby zaznaczyć w których przedziałach występują rodzice. Do celów QTL przydatna byłaby również analiza normalności rozkładu. Dane zestawione w tabelach 13, 14a i 14b z pewnością stanowią dobry punkt wyjścia do analizy QTL po uzyskaniu danych genotypowych. Wydaje się, że dla większości cech wybrane linie przekraczały zakres wartości uzyskiwanych dla rodziców. W dalszej części linie rekombinacyjne podzielono na grupy jednorodne na podstawie charakterystyki cech ilościowych i morfologicznych wykorzystując analizę skupień i składowych głównych. Wydaje mi się, że dane dotyczące plonowania w tabeli 14a i dotyczące składowych głównych tabela 16 są zbyt zaokrąglone. Pierwsze składowe są wyjaśniane przez cechy związane z wysokością rośliny i pędu głównego oraz długością kwiatostanu, natomiast kolejne dwie składowe PC3 i PC4 pomimo stosunkowo niewielkiego udziału w zmienności całkowitej reprezentują chyba najważniejszy element związany z plonowaniem.

W drugiej części omówienia wyników przedstawiono rezultaty badań nad przyspieszeniem uzyskiwania form homozygotycznych *L. angustifolius* trzema metodami. W pierwszym podejściu do indukcji haploidów wykorzystano pyłek trzech genotypów *L. luteus*. Przy omawianiu osadzania pyłku brakuje informacji o liczbie analizowanych słupków reprezentujących poszczególne kombinacje i przedziały czasowe, być może średnie dałoby się porównać statystycznie. Podobnie na przedstawionych na wykresie 18 wynikach kiełkowania pyłku i wzrostu łagiewek brakuje słupków błędów. Jak można wyjaśnić wyniki dla niektórych kombinacji, w których procent znamion z kiełkującym pyłkiem jest niższy od procentu łagiewek wrastających w słupek. Na podstawie dobrze udokumentowanej oceny histologicznej stwierdzono, że indukcja pyłkiem *L. luteus* może prowadzić do tworzenia zarodków po 168 godzinach od zapylenia. W dalszej części badano rozwój zalążków po 7, 14, 21 i 30 dniach hodowli *in vitro* ze szczególnym uwzględnieniem rozwoju kalusa. Stwierdzono istotny wpływ genotypu form rodzicielskich, pożywki oraz wszystkich interakcji w wybranych czasach hodowli. Wytypowano optymalnego donora pyłku i podłoże hodowlane. Wyniki opracowano statystycznie, zestawiono w tabelach 21-28 i udokumentowano na zdjęciach. Zdjęcie 14 jest mało czytelne.



W kolejnej części podjęto próbę uzyskania roślin haploidalnych łubinu wąskolistnego na drodze androgenyzy. Wybrano pąki kwiatowe zawierające mikrospory w optymalnym stadium rozwojowym. Wyniki opracowano statystycznie i stwierdzono istotne efekty genotypu, pożywki i terminu na rozwój mikrospor. Testowana dalej strategia przyspieszania cyklu w oparciu o metodę SSD, była bardziej skuteczna dla zarodków zbieranych po 28 dniach. Uzyskane wyniki są obiecujące pomimo problemów z aseptycznością kultury. Na wykresach 19-23 brakuje słupków błędów.

Dyskusję przeprowadzono analogicznie do układu wyników. Ze względu na wysokie współczynniki zmienności i transgresję badanych cech ilościowych, można zidentyfikować linie o wartościach pożądanych cech przewyższających rodziców. Z drugiej strony cech związane z wysokością pomimo niskiego współczynnika zmienności są najcenniejsze do mapowania QLT ze względu na najwyższą odziedziczalność. Doktorantka porównała uzyskane wartości współczynników korelacji i analizy PCA z danymi literaturowymi. Uwzględniła znaczenie warunków pogodowych a czasie prowadzenia doświadczenia. Autorka bardzo dobrze sobie poradziła z porównaniem wyników własnych dotyczących wysokości plonu, typu wzrostu i zawartości białka oraz tłuszczu z wynikami innych autorów.

W drugiej części dyskusji Autorka podsumowała wyniki badań własnych na tle obecnych osiągnięć w zakresie krzyżowań oddalonych i problemów z przełamywaniem barier krzyżowalności. Aktualny stan zaawansowania prac nad uzyskiwaniem roślin haploidalnych z mikrospor nie pozwala na wykorzystanie praktyczne tej metody. Z uwagi na niską skuteczność androgenyzy istnieje możliwość homozygotyzacji linii metodą SSD. Wyniki pracy przyczyniły się do optymalizacji tej procedury i potwierdzają możliwość jej praktycznego wykorzystania w hodowli łubinu wąskolistnego.

Podsumowując, do największych osiągnięć pracy można zaliczyć charakterystykę populacji linii rekombinacyjnych łubinu wąskolistnego pod względem zestawu cech ilościowych związanych z plonowaniem i cechami jakościowymi. Ocenie towarzyszyła identyfikacja linii przydatnych w hodowli. Stwierdzono zawiązywanie zarodków w wyniku krzyżowań oddalonych z linią *L. luteus*. Spośród testowanych metod haploidyacji, w wyniku pobudzenia mikrospor uzyskiwano struktury wielokomórkowe natomiast przyspieszenie homozygotyzacji uzyskano metodą SSD. Od strony edytorskiej praca zawiera sporo literówek i błędów w cytowaniu autorów publikacji, które nie obniżają wartości pracy.

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr inż. Anny Maciejewskiej-Hoza pt. „Zmienność wybranych cech użytkowych linii RILs łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.) oraz możliwości indukcji



procesu haploidyzacji”, spełnia kryteria określone w art. 13 ustawy z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789), uwzględniając rozporządzenie MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie profesora (DZ.U. z 2018 r. poz. 261) zgodnie z art. 179 ustawy z 3 lipca 2018 r. – Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Anny Maciejewskiej-Hoza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.