



UNIwersytet
PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU

WYDZIAŁ PRZYRODNICZO-TECHNOLOGICZNY

mgr inż. Anna Maciejewska-Hoza

**Zmienność wybranych cech użytkowych linii LIRs łubinu wąskolistnego
(*Lupinus angustifolius* L.) oraz możliwość indukcji procesu
haploidyzacji**

Variability of selected functional traits of LIRs lines of lupin narrow
leafed (*Lupinus angustifolius* L.) and the possibility of induction of the
haploidization process

Praca doktorska
wykonana pod kierunkiem:
dr hab. inż. Renata Galek, prof. uczelni
Promotor pomocniczy
dr inż. Bartosz Kozak

Wrocław, rok 2023

Składam serdeczne podziękowania

Pni dr hab. inż. Renacie Galek prof. uczelni

za opiekę naukową, wsparcie merytoryczne i cenne rady,
które pomogły mi w realizacji niniejszej pracy

Panu dr inż. Bartoszowi Kozakowi

za cenne wskazówki i pomoc przy analizie statystycznej
wyników moich badań

Panu dr Dariuszowi Zalewskiemu

za poświęcony czas i nieocenioną pomoc
podczas realizacji mojej pracy

Pani mgr inż. Marcie Buzar oraz Pani mgr Kindze Zydorowicz

za pomoc w realizacji badań polowych i laboratoryjnych

Mojemu mężowi Michałowi,

rodzicom Renacie i Maciejowi oraz Małgorzacie i Januszowi – za miłość i wsparcie
jakim obdarzaliście mnie na co dzień

Rodzinie i Przyjaciołom – za dodawanie otuchy i wsparcie

Spis treści

I. Streszczenie	6
I. Abstract	8
II. Wstęp i cel badań.....	10
III. Stosowane skróty.....	13
IV. Przegląd literatury.....	15
1. Systematyka i biologia <i>L. angustifolius</i> L.	15
2. Występowanie i historia uprawy rodzaju <i>Lupinus</i>	16
3. Znaczenie gospodarcze łąbinu wąskolistnego (<i>Lupinus angustifolius</i> L.).....	17
4. Kierunki hodowli <i>Lupinus angustifolius</i> L.	20
5. Wykorzystanie kultur <i>in vitro</i> dla doskonalenia <i>L. angustifolius</i> L. w odniesieniu do innych gatunków z rodzaju <i>Lupinus</i>	23
5.1. Mikrorozmnażanie <i>Lupinus angustifolius</i> L. oraz innych przedstawicieli <i>Lupinus</i> 23	
5.2. Krzyżowanie oddalone- otrzymywanie mieszańców w rodzaju <i>Lupinus</i>	25
5.3. Techniki otrzymywania roślin haploidalnych	27
5.4. Androgenesa w rodzaju <i>Lupinus</i>	29
V. Materiały i metody.....	32
1. Doświadczenie polowe	32
1.1. Materiał badawczy	32
1.2. Metody – doświadczenie polowe - ocena zmienności fenotypowej linii RILs łąbinu wąskolistnego pod względem cech użytkowych	32
1.3. Warunki klimatyczne	33
1.4. Analiza statystyczna	34
2. Doświadczenie laboratoryjne	34
2.1. Materiał badawczy- androgenesa, krzyżowanie oddalone oraz SSD	34

2.2.	Metody laboratoryjne – androgeniza, krzyżowanie oddalone oraz technika SSD	35
2.2.1.	Metody badawcze - ocena zdolności do androgenyzy czterech genotypów łubinu wąskolistnego za pomocą kultur izolowanych mikrospor	35
2.2.2.	Metody badawcze- krzyżowania oddalonego <i>L. angustifolius x L. luteus</i>	36
2.2.3.	Metody badawcze - uzyskanie kilku pokoleń łubinu wąskolistnego w oparciu o metodę pojedynczych nasion (SSD).....	38
2.3.	Warunki klimatyczne	40
2.4.	Analiza statystyczna.....	40
VI.	Omówienie wyników.....	41
1.	Ocena zmienności fenotypowej linii RILs łubinu wąskolistnego pod względem cech użytkowych.....	41
2.	Możliwość skrócenia procesu homozygotyzacji u <i>L. angustifolius</i> L. na drodze indukcji haploidów oraz zastosowania techniki SSD	45
2.1.	Wykorzystanie krzyżowania oddalonego <i>L. angustifolius x L. luteus</i> do indukcji haploidów.....	45
2.1.1.	Ocena zachowania pyłku w czasie prowadzenia krzyżowania oddalonego łubinu wąskolistnego	45
2.2.	Ocena zdolności do androgenyzy czterech genotypów łubinu wąskolistnego za pomocą kultur izolowanych mikrospor.....	49
2.3	Uzyskanie kilku pokoleń łubinu wąskolistnego w oparciu o metodę pojedynczych nasion (SSD).	51
VII.	Dyskusja	53
1.	Ocena zmienności fenotypowej linii RILs łubinu wąskolistnego pod względem cech morfologicznych i struktury plonu.....	53
2.	Możliwość indukcji roślin haploidalnych u łubinu wąskolistnego na drodze krzyżowania oddalonego oraz androgenyzy	59
3.	Uzyskanie kilku pokoleń łubinu wąskolistnego w oparciu o metodę pojedynczych nasion (SSD).....	61
VIII.	Wnioski.....	63

IX.	Bibliografia.....	64
X.	Tabele	82
XI.	Wykresy.....	142
XII.	Zdjęcia	158
XIII.	Spis tabel, wykresów i zdjęć.....	172

I. Streszczenie

Celem badań było przeprowadzanie charakterystyki zmienności nowej kolekcji linii RILs łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.) pod względem cech morfologicznych, wybranych elementów struktury plonu, a także parametrów jakościowych nasion (zawartość białka i tłuszczu). W niniejszej pracy wykorzystano 108 linii pochodzącej z kolekcji własnej Katedry Genetyki Hodowli Roślin i Nasiennictwa. Linie otrzymano przez skrzyżowanie linii Lae-1 z 'Emir', co stanowiło odwrotny układ krzyżowania w stosunku do istniejącej już populacji mapującej „ExL”. Doświadczenie prowadzono przez trzy sezony wegetacyjne w Stacji Hodowli Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, Oddział Przebędowo. Otrzymane wyniki opracowano statystycznie, a dla poszczególnych cech obliczono wartości średnie, minimalne i maksymalne oraz współczynnik zmienności. Sporządzono histogramy rozkładu, a ponad to obliczono współczynnik korelacji między badanymi cechami. W pracy wykorzystano również metodę analizy składowych głównych PCA, w celu wyodrębnienia cech, które wnoszą największą zmienność.

Obliczone współczynniki korelacji wskazują na istotne zależności pomiędzy takimi cechami jak: długość kwiatostanu a liczba okółków, długość kwiatostanu a liczbą zawiązywanych strąków oraz pomiędzy wysokością pędu głównego a wysokością całej rośliny. U badanych obiektów stwierdzono dużą zmienność liczby okółków na pędzie głównym (50,5%), liczby zawiązanych strąków na pędzie głównym (48,1%) oraz liczby zawiązanych strąków na pędzie bocznym (49,1%). Z kolei niewielką zmienność zaobserwowano w zawartości białka (4,8%) i tłuszczu (5,3%), a także wysokości pędu głównego (4,5%) oraz wysokości całej rośliny (4,8%). Spośród wszystkich badanych linii RILs pochodzących z populacji Lae-1 x 'Emir' wytypowano linie - 332, 268, 324 i 333. Linie te mogą być przydatne jako materiał wyjściowy do hodowli z uwagi na wysoką zawartość białka i tłuszczu. Zebrane dane z niniejszych badań posłużą do dalszej selekcji, a w przyszłości ułatwią wykorzystanie tej nowej populacji mapującej do badań genetycznych.

Celem drugiej części pracy było zbadanie możliwości otrzymywania roślin haploidalnych na drodze androgenezy oraz wykorzystania pyłku obcego – *Lupinus luteus* L. do metody krzyżowania oddalonego. Ostatnim elementem było zbadanie możliwości otrzymania kilku pokoleń w ciągu jednego roku za pomocą techniki SSD (*single seed descent*). Do wszystkich doświadczeń użyto cztery genotypy łubinu wąskolistnego ('Emir', 'Graf', 'Karo' i Lae-1). Przed rozpoczęciem indukcji procesu androgenezy, oceniono stadium rozwojowe zebranych losowo pąków. Do indukcji rozwoju mikrospor wykorzystano podłoże

B5 oraz B5 + 0,5 mg·dm⁻¹ BA. Obserwacje wykonywano co 7 dni przez cztery tygodnie. Na podstawie analizy wyników badań stwierdzono, że genotyp, termin oraz pożywka wpłynęły znacząco na rozwój mikrospor. Ponadto najczęściej struktur wielokomórkowych odnotowano u ‘Graf’ na podłożu B5 oraz B5+0,5 mg dm⁻¹ BA i u ‘Karo’ na podłożu B5.

Jako donora pyłku do krzyżowania roślin wykorzystano trzy genotypy łąbinu żółtego (500, 501 i Przebędowo). Uzyskane zalążki zostały wyłożone na trzy różne podłoża hodowlane (B5, NLN, ML6). Na podstawie zebranych wyników z obserwacji rozwoju zalążków przeprowadzono trójczynnikiem analizę wariancji. Zarówno ‘Emir’ jak i ‘Karo’ charakteryzowały się największą ilością zalążków z widocznymi zmianami po 30 dniach od założenia kultury.

Do techniki SSD pobrano strąki w dwóch terminach (14 i 28 dni), a następnie wyłożono na pożywce B5 i B5 +2,0 mg·dm⁻¹ BA + 0,1 mg·dm⁻¹ IBA. Zarodki zygotyczne zebrane po 28 dniach od kwitnienia podjęły regenerację, a następnie przekształciły się w rośliny. Zastosowana metoda SSD pozwoliła na otrzymanie trzech pokoleń łąbinu wąskolistnego w ciągu jednego roku.

I. Abstract

The aim of the research was to characterize the variability of a new collection of narrow-leaved lupin RILs lines (*L. angustifolius* L.) in terms of morphological traits, selected yield structure elements, and seed quality parameters (protein and fat content). In this study, 110 lines from the private collection of the Department of Plant Breeding and Seed Science were used. The lines were obtained by crossing the Lae-1 line with 'Emir', which constituted a reverse crossing scheme compared to the existing mapping population "ExL." The experiment was conducted for three growing seasons at the Stacja Howodli Roślin Smolice, Grupa IHAR, Oddział Przebędowo (Smolice Plant Breeding Station, IHAR Group, Przebędowo Branch). The obtained results were statistically analysed, and for each trait, mean, minimum, and maximum values, as well as the coefficient of variation, were calculated. Histograms of distribution were prepared, and furthermore, the correlation coefficient between the examined traits was calculated. The principal component analysis (PCA) method was also used in the study to extract the properties that contribute the most to the variability. The calculated correlation coefficients indicate significant relationships between traits such as inflorescence length and the number of whorls, inflorescence length and the number of formed pods, as well as between the height of the main stem and the overall height of the plant. The examined objects exhibited a high variability in the number of pods on the main stem (50,5%), the number of formed pods on the main stem (48,1%), and the number of formed pods on the lateral stem (49,1%). On the other hand, slight variability was observed in protein content (4,8%), fat content (5,3%), height of the main stem (4,5%), and overall plant height (4,8%). Among all the examined RILs lines derived from the Lae-1 x 'Emir' population, the following lines were selected: 332, 268, 324 and 333. From a breeding perspective, these lines may be useful due to their high protein and fat content. The data collected from this study will serve for further selection and, in the future, facilitate the creation of a new mapping population.

The aim of the second part of the study was to investigate the possibility of obtaining haploid plants through androgenesis and to utilize foreign pollen - *Lupinus luteus* L. - for the method of distant crossing. The final aspect involved obtaining several generations within one year using the Single Seed Descent (SSD) technique. Four narrow-leaved lupin varieties ('Emir', 'Graf', 'Karo' and Lae-1) were used for all experiments. Before initiating androgenesis induction, the developmental stage of randomly collected flower buds was assessed. B5 and B5 + 0.5 mg·dm⁻¹ BA media were used for microspore development induction. Observations were made every 7 days for four weeks. Based on the analysis of the research results, it was

found that genotype, timing, and media significantly influenced microspore development. Moreover, the highest number of multicellular structures was observed in 'Graf' on B5 and B5 + 0.5 mg·dm⁻¹ BA media, as well as in 'Karo' on B5 medium.

Three genotypes of yellow lupin (500, 501 and Przebędowo) were used as pollen donors for plant crossing. The obtained embryos were cultured on three different growth media (B5, NLN, ML6). Based on the collected results from the observation of embryo development, a three-factor analysis of variance was conducted. Both 'Emir' and 'Karo' exhibited the highest number of embryos with visible changes 30 days after initiating the culture.

For the SSD technique, pods were collected at two time points (14 and 28 days) and then cultured on B5 and B5 + 2.0 mg·dm⁻¹ BA + 0.1 mg·dm⁻¹ IBA media. Zygotically derived embryos collected 28 days after flowering underwent regeneration and subsequently developed into plants. The applied SSD method allowed for obtaining three generations of narrow-leafed lupin within one year.

II. Wstęp i cel badań

Łubin wąskolistny (*L. angustifolius* L.) to jednoroczny gatunek, który ze względu na wiele zalet ekologiczno – ekonomicznych jest najchętniej uprawiany zarówno w Polsce jak i na Świecie [GUS, FAOSTAT 2021]. *L. angustifolius* L. wyróżnia się najkrótszym okresem wegetacji ze wszystkich 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, które są niezbędne dla roślin [Krawczyk i Mrówczyński 2012, Różewicz 2019]. Z uwagi na znaczącą zawartość białka w nasionach, łubin wąskolistny wyznacza nowy kierunek w żywieniu człowieka, wchodząc do naszej codziennej diety. W przypadku żywienia zwierząt może być również alternatywą dla śruty sojowej dodawanej do pasz [Krawczyk i Mrówczyński 2012, Lammi i in. 2016, Sipsas 2008].

Prowadzone od wielu lat badania pozwoliły hodowcom na uzyskanie odmian o znaczącej odporności polowej na antraknozę. Za sukces uznaje się również otrzymanie form niskokaloidowych o niepekających jednocześnie strąkach [Jędrzycka i Kaczmarek 2012, Romeo i in. 2018]. Mimo wszystko dużym problemem, z którym nadal borykają się hodowcy, jest niestabilność plonowania. W tym przypadku jednak rozwiązaniem mogą stać się nowoczesne narzędzia biotechnologiczne, takie jak markery molekularne i kultury *in vitro*.

U łubinu wąskolistnego opracowano kilka markerów molekularnych MAS. Przykładem mogą być australijscy naukowcy, którzy badali łubin pod kątem odporności. Opracowali oni markery molekularne AntjM1 i AntjM2, które są wykorzystywane podczas selekcji genotypów w odporności polowej na antraknozę [Nelson i in. 2008, You i in. 2005, Yang i in. 2008]. Nie znane jest genetyczne podłoże determinujące plonu i potencjał plonotwórczy. Dlatego z uwagi na zmieniający się klimat, warto jest szukać genów, które pozwolą na skrócenie okres wegetacji i szybkie dojrzewanie nasion. Gen *Ku*, który odpowiada za termo neutralność, dlatego rośliny z tym genem charakteryzują się szybszym kwitnieniem (od 2 do 5 tygodni) [Boersma i in. 2005]. Istotne znaczenie ma również cecha rozgałęzienia u łubinów, która warunkowana jest przez recesywny gen *mut 1* [Święcicki i in. 1995]. Z punktu widzenia udomowienia istotne znaczenie ma również zawartość alkaloidów w nasionach łubinów, która jest warunkowana przez geny *Iucundis (inc)* nadający gorzki smak, *depressus (dep)* oraz *esculentus (es)*- wpływające na pośrednią zawartość alkaloidów [Boersma i in. 2005, Galek i in. 2017, Święcicki i in. 1995].

Dla łąbinu wąskolistnego opracowano dwie australijskie populacje mapujące RILs: „DxW” [Hane i in. 2016] oraz „TxU” [Yang i in. 2013]. Populacja „DxW” wywodzi się ze skrzyżowania formy australijskiej, udomowionej (D) z genotypem populacji dzikiej, pochodzącej z Maroka (W) [Boersma i in. 2005]. Stworzona populacja została wykorzystana do sporządzenia szeregu map opartych na różnych markerach molekularnych: SSR, DArT, BAC, SNP, AFLP, SSR czy STS. Dodatkowo dla populacji „DxW” zdecydowano się zidentyfikować QTL dla takich cech jak: zawartość alkaloidów czy plon nasion [Nelson i in. 2010, Nelson i in. 2006, Kroc i in. 2014, Kroc i in. 2011]. Druga populacja mapująca typu RILs to „TxU”, którą udało się otrzymać ze skrzyżowania „Tanjil” z „Unicrop”. Odmiana Tanjil charakteryzowała się wysoką odpornością na antraknozę czy szarą pleśń liści [Zhou i in. 2017]. Z kolei „Unicrop” była pierwszą w pełni udomowioną odmianą wczesnokwitnącą z niską zawartością alkaloidów. Do stworzenia mapy „TxU” wykorzystano markery sekwencyjne SNP oraz PAV, które otrzymano dzięki technice sekwencjonowania RAD [Yang i in. 2013]. Trzecia populacja Emir x Lae-1 powstała ze skrzyżowania polskiej odmiany Emir i białoruskiej linii hodowlanej Lae-1, pochodzących z kolekcji Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Mapę genetyczną stworzono w oparciu o nowy typ markerów (DArTseq). Dzięki niej będzie możliwe określenie *loci* cech ilościowych (QTL) czy ulepszyć istniejący już genom referencyjny w sekwencjonowaniu całego genomu (WGS) [Kozak i in. 2019]. Populacja „ExL” posiada inne podłoże genetyczne niż dwie istniejące już populacje RILs dla łąbinu wąskolistnego, co daje nowe możliwości w dalszych badaniach genetyczno-hodowlanych.

Dużym problemem przy generowaniu linii RILs u łąbinu wąskolistnego jest czasochłonność ich wyprowadzania, przy braku efektywnych metod homozygotyzacji. Na otrzymanie cech użytkowych potrzeba kilkunastu lat. Najdłużej trwają prace przy selekcji i homozygotyzacji materiałów mieszańcowych. W oparciu o nowe metody biotechnologiczne np. techniki haploidyzacji roślin w kulturach *in vitro*, a następnie dihaploidyzacji, proces hodowlany udaje się skrócić u innych gatunków nawet o 4 – 6 lat [Michalik 2009]. Najpopularniejszymi technikami uzyskania roślin haploidalnych są procesy androgenezy i gynogenezy [Pluta i in. 2013]. W procesie androgenezy mikrospory w odpowiednim stadium pobudzane są do tworzenia kalusa czy też zarodków haploidalnych a następnie roślin haploidalnych. W przypadku procesu gynogenezy izolowane są zalążki. Po udanym zwielokrotnieniu liczby chromosomów otrzymujemy homozygotyczny materiał w postaci linii dihaploidalnych [Bayliss i in. 2004, Michalik 2009]. łąbin wąskolistny należy do trudnych roślin w hodowli kultur *in vitro*. Do tej pory nie udało się otrzymać roślin

haploidalnych a następnie linii dihaploidalnych. Wciąż jednak prowadzone są badania, w celu udoskonalenia procesu haploidyzacji [Bayliss i in. 2004, Kozak i in. 2012]. Jeżeli metody androgenezy i gynogenezy nie przynoszą rezultatów w uzyskaniu roślin, alternatywą staje się krzyżowanie oddalone, bazujące na donorze obcego pyłku. Obecnie krzyżowanie oddalone stosowane jest u zbóż, gdzie na drodze eliminacji chromosomów uzyskuje się haploidy a następnie diploidalne stabilne linie o korzystnych cechach: lepszym plonowaniu, zwiększonej zawartości białka w nasionach czy odporności na choroby [Plutat i in. 2013].

W pierwszej części tej pracy doktorskiej celem było przeprowadzanie 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].

Obie wspomniane populacje mapujące reprezentują tło genetyczne polskiej hodowli. Populacja „ExL” została scharakteryzowana pod względem cech morfologicznych oraz elementów struktury plonu. Okazała się również przydatna do wygenerowania mapy genetycznej.

W drugiej części pracy doktorskiej wykorzystane zostały cztery genotypy łubinu wąskolistnego ('Emir', 'Graf', 'Karo' i Lae-1), w celu zbadania możliwości otrzymywania roślin haploidalnych na drodze androgenezy 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.

Hipotezy badawcze

1. Populacja 'LxE' charakteryzuje się odpowiednim zakresem zmienności i może wykorzystana w przyszłości do genotypowania.
2. Techniki krzyżowania oddalonego oraz izolowanych mikrospor są właściwym narzędziem do uzyskania roślin haploidalnych.
3. Wykorzystując technikę SSD, w ciągu roku możliwe jest uzyskanie kilku pokoleń *L. angustifolius* L.

III. Stosowane skróty

2,4 D - kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy, regulator wzrostu z grupy auksyn

2iP - 2-izopentyloadenina, regulator wzrostu z grupy cytokinin

AC – węgiel aktywny dodawany do podłoża hodowlanego

AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism*, polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów

BA - 6-benzyloadeninopuryna, regulator wzrostu z grupy cytokinin

BAC – *Bacterial Artificial Chromosome*, sztuczny chromosom bakteryjny

BAP - 6-benzyloaminopuryna, regulator wzrostu z grupy cytokinin

BC - podłoże hodowlane Blaydes (1996)

B5 – podłoże hodowlane Gemborga (1986)

C17 - podłoże hodowlane Wang i Chen (1983)

DAPI – 4,6 diamidyno- 2 – fenyloindol

DArT – *Diversity Arrays Technology*- sekwencjonowanie DNA za pomocą enzymów restrykcyjnych

DH – *doubled haploids*, podwójne haploidy

GA₃– kwas giberelinowy, hormon wzrostu roślin

IAA - kwas indoliloctowy, regulator wzrostu z grupy auksyn

IBA - kwas indolilomasłowy, regulator wzrostu z grupy auksyn

Kin - *N*-6-furfuryladenina, regulator wzrostu z grupy cytokinin

KM – pożywka zmodyfikowana przez Kao i Michayluk (1975)

***L. luteus* 500** – *L. luteus* Ukraina 12 SPFS 2007

***L. luteus* 501**- *L. luteus* cv. Potalong SPFS 2007

***L. luteus* Przebédowo**- linia hodowlana ze stacji Przebédowo

MAS - *Marker Assisted Selection*, selekcja wspomagana markerami

MS – podłoże hodowlane Murashige i Skoog (1964)

NAA - kwas naftylo-1-octowy, regulator wzrostu z grupy auksyn

N&N – podłoże hodowlane Nitsch i Nitsch (1969)

NNB5 - podłoże hodowlane zawierające makroelementy z pożywki N&N oraz mikroelementy z pożywki B5

PAV – *Present Absent Variant*, marker – brak lub obecność produktu

PGR – *plant growth regulator*, roślinny regulator wzrostu

QTL – *Quantitative Trait Loci* – cechy ilościowe (determinowane wielogenowo)

RAD – *Restriction site Associated DNA markers*, restrykcyjne markery DNA

RIL – *Recombinant Inbred Line*, Rekombinacyjne linie wsobne

S&H – podłoże hodowlane Schenk i Hildebrandt (1972)

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*, polimorfizm pojedynczego nukleotydu

SSD - *single seed descent*, metoda pojedynczych nasion

SSR – *Simple Sequence Repeats*, proste sekwencje powtórzone

STS – *Sequence-Tagged Sites*, sekwencje znaczone miejscowo

Zea.- zeatyna, hormon roślinny z grupy cytokinin

IV. Przegląd literatury

1. Systematyka i biologia *L. angustifolius* L.

Łubin wąskolistny (*L. angustifolius* L.) należy do plemienia *Genistea* oraz podplemienia *Lupinae*, gromady *Magnoliphyta*, rzędu *Fabales* i rodziny bobowatych *Fabaceae* [Jasińska i Kotecki 2020, Lewis i in. 2005].

Biorąc pod uwagę biologię, *Lupinus angustifolius* L. wyróżnia się na tle pozostałych uprawianych gatunków. Łubin wąskolistny o tradycyjnym wzroście może tworzyć jeden, dwa, a czasem trzy rzędy rozgałęzień. U tego gatunku popularne są też rośliny o zdeteterminowanym typie wzrostu, które zamiast części bocznych pędów mogą tworzyć w tych miejscach kwiaty. Trzeci typ pokroju- epigonalny cechuje rośliny, które nie wytwarzają rozgałęzień, a tylko kwiaty [Adhikari i in. 2001, Galek 2010]. Na pokrój rośliny i morfologię może wpływać wiele czynników, w tym agrotechnika (ilość wysianych nasion na poletku). Zbyt gęsty wysiew wpływa na wysokość roślin i może powodować wyleganie. Z kolei zbyt rzadki wysiew prowadzi do intensywnego rozkrzewiania się roślin przedłużając okres wegetacji i powodując nierównomierne dojrzewanie strąków. [Bieniaszewski i in. 2012, Jasińska i Kotecki 2020, Krawczyk i Mrówczyński 2012, Stawiński 2016]. Łubin ma łodygę, która przybiera sztywną formę, dzięki czemu nie jest aż tak bardzo podatna na wyleganie. Wąskie liście (typu palczastego) równomiernie pochłaniają światło, co w rezultacie prowadzi do szybkiego wysychania pola po silnych opadach deszczu [Sawicka – Sienkiewicz 1997, Galek in. 2006]. Kwiatostan łubinu ma postać grona znajdującego się na wierzchołku pędu. Ze względu na barwy kwiatów i nasion łubin dzieli się na botaniczne odmiany, które mają takie kolory kwiatów i nasion jak: kwiaty i nasiona białe, kwiaty niebieskie i nasiona nakrapiane, kwiaty różowe, nasiona szare i nakrapiane, kwiaty fioletowe i nasiona mocno nakrapiane z ciemnobrązowym wzorem.

W odróżnieniu od łubinu żółtego i białego, wąskolistny jest najbardziej samopylny, co ułatwia prace selekcyjne [Jasińska i Kotecki 2020, Galek 2006, Kole 2011].

2. Występowanie i historia uprawy rodzaju *Lupinus*

Łubin znany jest człowiekowi od tysiącleci. Jego nazwa zwyczajowa *lupinii* była używana przez starożytnych Rzymian, którzy chętnie uprawiali tę roślinę na terenie całego Imperium, a jego ziarna stanowiły dla nich odpowiednik kawy [Glandstones 1998]. Dodatkowo wykorzystywano go, jako środek leczniczy oraz nawóz na plantacjach winorośli. Znany był również Egipcjanom. Potwierdzają to wykopaliska archeologów, którzy znajdowali nasiona *L. albus* w grobowcach faraonów, ale zakres i cel użytkowania łubinu pozostają nieznane [Clements i in. 2005, Glandstones 1998].

Bogatą różnorodność gatunków łubinu można pogrupować według obszarów ich występowania na: Basen Morza Śródziemnomorskiego i Afryki (Stary Świat) oraz Amerykę (Nowy Świat) [Bayer i in. 1999, Naganowska i in. 2003]. Spośród wszystkich występujących na całym świecie 275 gatunków, jedynie 4 wykorzystuje się w uprawie [Kroc i in. 2014, Zoga i in. 2010]. Tak więc w rolnictwie istotne znaczenie mają: łubin żółty (*Lupinus luteus*), łubin wąskolistny (*Lupinus angustifolius*), łubin biały (*Lupinus albus*) oraz andyjski (*Lupinus mutabilis*). Odróżnia je barwa kwiatów, wartości odżywcze oraz wymagania uprawowe [Barbacki 1975, Kole 2011].

Warto w tym miejscu zwrócić uwagę na łubin andyjski, który jako jedyny spośród wszystkich gatunków występujących na terenie obu Ameryk nadaje się do uprawy. Zaletą *Lupinus mutabilis* jest przede wszystkim wysoka zawartość białka i tłuszczu w nasionach [Bayer i in. 1999, Hane i in. 2016, Sawicak- Sienkiewicz i in. 2006]. Znaczna część gatunków zajmuje obszary obu Ameryk [Jasińska i Kotecki 2020], gdzie zasięg ich występowania obejmuje strefy o skrajnych warunkach klimatycznych. Ponad 200 gatunków łubinu rozmieszczonych jest od Alaski po Południową Argentynę i Chile. Występują po obu stronach Andów, przy czym niektóre gatunki można spotkać w środkowo-wschodniej części Ameryki Południowej i są to przeważnie wieloletnie, wysokogórskie byliny (np. *Lupinus polyphyllus*).

Łubin wąskolistny (*Lupinus angustifolius* L.) pochodzi z terenów Turcji i Syrii, jednak największa różnorodność form występuje wokół Morza Egejskiego [Cowling 1998, Sawicka – Sienkiewicz i in. 2006]. W Europie nazywany jest niebieskim łubinem, ponieważ w stanie dzikim kolor kwiatów łubinu wąskolistnego ma barwę niebieską. Wzmianki na temat *L. angustifolius* L. sięgają XVIII wieku, jednak jego udomowienie zostało zainicjowane dopiero na początku XX wieku w Niemczech i trwało do lat 60 XX wieku w Australii. W tym czasie udało się wyprowadzić odmiany słodkie o niskiej zawartości alkaloidów [Gladstones 1998,].

Obecnie, obok łubinu żółtego, to właśnie wąskolistny stanowi podstawowy gatunek uprawny zarówno w Polsce jak i w całej Europie czy na świecie [GUS, FAOSTAT 2021].

3. Znaczenie gospodarcze łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.)

Łubin to gatunek o bardzo zróżnicowany znaczeniu. Ze względu na korzystny wpływ na strukturę i skład gleby dla roślin następczych, nadzwyczajną adaptację w warunkach niekorzystnych oraz wykorzystanie upraw do celów paszowych zyskał w ostatnich latach istotne znaczenie w gospodarce.

W Polsce największe znaczenie w uprawie roślin strączkowych, obok grochu siewnego i bobiku, ma łubin wąskolistny [Florek 2017]. Nasz kraj, zaraz po Australii, jest największym producentem nasion tej rośliny na świecie. Według Prusińskiego (2018), najwięcej zarejestrowanych odmian łubinu wąskolistnego pochodzi z Polski i Niemiec. Krajowy Rejestr Odmian z 2022 roku obejmuje 30 zarejestrowanych odmian łubinu wąskolistnego różniących się cechami morfologicznymi i użytkowymi. Spośród nich, aż 24 to odmiany niesamokończące (np. Karo) i 6 odmian samokończących (np. Sonet, Regent). Dla porównania w obrębie łubinu żółtego zarejestrowano tylko 11 odmian. W 2021 roku powierzchnia uprawy wszystkich gatunków łubinów wynosiła ok. 190 tys. ha (w 2017 r. było to 103 tys. ha a w 2018 95 tys. ha) [COBORU, GUS], z kolei według COBORU 2022 powierzchnia zakwalifikowanych plantacji nasiennych łubinu wąskolistnego wyniosła ok. 4792 ha (35 % wszystkich roślin strączkowych uprawianych w Polsce).

Wzrastające zainteresowanie integrowaną uprawą roślin przyczynia się do osiągnięcia równowagi rolno-środowiskowej. Wykorzystywane w rolnictwie rośliny strączkowe wnoszą wiele korzyści, co wyróżnia je spośród innych gatunków uprawnych. Łubin wysiewany jako przedplon wpływa pozytywnie na plon roślin następczych takich jak: zboża, rośliny przemysłowe i okopowe [Kapusta 2017, Krawczyk i Mrówczyński 2012]. W integrowanej ochronie na obszarach rolniczych, łubin wąskolistny ogranicza występowanie niepożądanych chwastów, owadów czy grzybów minimalizując tym samym stosowanie środków ochrony roślin [Krawczyk i Mrówczyński 2012, Piekarczyk 2007]. Korzystne działanie następcze dla zbóż mają mieszanki strączkowo-zbożowe. Przeprowadzone (2017) przez Podleśnego i Podleśną badania wykazały, że mieszanka łubinu wąskolistnego z jęczmieniem jarym bardzo dobrze wpływa na plonowanie i cechy struktury plonu pszenicy ozimej [Podleśny i Podleśna 2017]. W rolnictwie zrównoważonym symbioza łubinu z bakteriami brodawkowymi z gatunku *Bradyrhizobium* daje wiele korzyści. Przede wszystkim zmniejszone jest

zapotrzebowanie roślin na sztuczne nawozy azotowe. Taki zabieg pozwala na ograniczenie zanieczyszczenia środowiska. Azot uzyskany z łubinu jest mniej podatny na straty niż w sztucznych nawozach azotowych. Zasymilowany w roślinach motylkowych azot wpływa pozytywnie na strukturę gleby i zawartość tego pierwiastka dla kolejnych upraw w płodozmianie (dostarcza od 40 – 80 kg/ha azotu). Ponadto, dzięki resztkom poźniwym, wzbogaca glebę w makroelementy i mikroelementy oraz w próchnicę [Szczepaniak 2013]. Rośliny następcze są zatem zdrowsze, a ich plon znacznie wyższy [Hatano i Lipiec 2004, Krawczyk i Mrówczyński 2012, Podleśny i Podleśna 2017].

Oprócz azotu na strukturę gleby i rozwój roślin następczych wpływają też inne pierwiastki takie jak: potas, wapń czy fosfor. Głęboki, palowy system korzeniowy łubinu wąskolistnego rozluźnia warstwę podorną. Pierwiastki po przeniesieniu do wyższych warstw gleby są łatwiejsze do przyswojenia przez rośliny następcze o płytszym systemie korzeniowym [Hejdysz i in. 2013, Krawczyk i Mrówczyński 2012].

Zwiększające się zapotrzebowania na wysokobiałkowe pasze przyczynia się do sukcesywnego wzrostu powierzchni uprawowych roślin strączkowych. Nasiona roślin bobowatych są bardzo ważnym źródłem białka paszowego, choć wciąż niedocenianym przez rolników [Różewicz 2019]. Według szacunków Instytutu Ekonomiki Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej, zapotrzebowanie na białko paszowe w Polsce, w przypadku nasion bobowatych, wynosi 6,5%. Z kolei zapotrzebowanie na śrutę sojową to aż 62 % [Grela i Czech 2019]. Z uwagi na wysoką wartość odżywczą, łubin śmiało może konkurować z importowaną genetycznie zmodyfikowaną śrutą sojową. Jego nasiona, w zależności od gatunku, zawierają 28% - 48% białka (łubin żółty - 40,1 %, łubin biały – 34,6 %, łubin wąskolistny - 29,6%) [Jasińska i Kotecki 2020, Sobotka i in. 2016]. Stawiński (2016) podaje, że największą koncentrację białka w nasionach łubinu wąskolistnego w 2015 roku miały odmiany: Neptun (32,8%), Graf (32,2%), Dalbor (32,4%), Rumba (32,5%) i Tango (32,7%). Z kolei najnowsze dane COBORU z 2022 donoszą o jednej dodatkowej odmianie- SM Orion (31,3%). Ponadto łubin posiada wysoką wartość energetyczną (ok. 14–16 MJ energii strawnej w kilogramie), która wynika ze znacznej zawartości tłuszczów (szacowanej na poziomie 4,0–9,0%) [Barczak i in. 2013, Różewicz 2019]. Nasion łubinu są bogate w lizynę oraz argininę, stanowią również cenne źródło lipidów, błonnika, minerałów i witamin [Jasińska i Kotecki 2020, Sobotka i in. 2016].

Dużym sukcesem w hodowli było uzyskanie nasion łubinu wąskolistnego o obniżonej zawartości alkaloidów. Znajdujące się w łubinach alkaloidy są metabolitami wtórnymi magazynowanymi przez roślinę. Z punktu widzenia medycyny, związki te w niewielkich

ilościach działają korzystnie na choroby serca, skóry oraz kojąco na układ nerwowy. W hodowli dąży się do zminimalizowania zawartości alkaloidów i uzyskania jak najśodszych odmian. Do tej pory udało się otrzymać trzy takie odmiany: Wars, Regent, Lazur, które charakteryzowały się bardzo niską zawartością alkaloidów (0,012- 0,014%) [Romeo i in. 2018, Stawiński 2016, Magalhães i in. 2017].

Słodkie odmiany łubinu wąskolistnego są alternatywą w żywieniu zwierząt, gdyż znajdują zastosowanie jako dodatek do mieszanek strączkowo- zbożowych. Pasze treściwe, uzyskane z takich mieszanek, są bogatym źródłem białka i dlatego są spożywane przez zwierzęta [Buraczyńska 2010]. Podjęte przez Płazę i in. (2014) badania pozwoliły stwierdzić między innymi, że mieszanka łubinu wąskolistnego z żytem jarym (w stosunku 50:50) zapewnia wysoki plon białka ogólnego. Z kolei w pracy napisanej w 2017 roku badacze ustalili, że wysoka zawartość składników mineralnych jest obecna w łubinie wąskolistnym uprawianym w siewie czystym oraz w połączeniu z żytem jarym (75 i 25 % w udziale komponentów).

Grela i Czech (2019) uważają, że najlepszymi paszami dla świń (poza soją) są między innymi łubin żółty i wąskolistny, które mogą być cennym źródłem białka. Jednak w celu uzyskania oczekiwanych rezultatów w chowie, nie powinno się przekraczać zalecanej dawki nasion w mieszankach. Dla prosiąt (do 20 kg) oraz knura powinno to być 5 % maksymalnego udziału nasion łubinu wąskolistnego, natomiast dla tuczniaka nie powinno się przekraczać 15 %. Podobnie uważają Hanczakowska i Świątkiewicz (2015). Sugerują, że bezpieczny poziom zawartości nasion łubinu nie powinien przekraczać 20%, ponieważ świnię są wrażliwe na alkaloidy i nie spożywają pasz z ich wysoką zawartością. Dlatego w produkcji pasz stosowane są odmiany słodkie. Z uwagi na niską zawartość alkaloidów Poznańska Hodowla Roślin poleca odmiany takie jak: Salsa oraz Samba [Poznańska Hodowla Roślin 2018].

W przypadku drobiu zalecany procentowy udział nasion łubinu w mieszankach wynosi 5-10% [Dzwonkowski 2016, Grela i Czech 2019]. Łubin wąskolistny jest dobrym źródłem białka, ale słabym źródłem aminokwasów siarkowych dla kurcząt brojlerów [Różewicz 2019]. Konieczka i Smulikowska (2017) uważają, że w zależności od odmiany, łubin wąskolistny posiada składniki odżywcze niezbędne w diecie drobiu. Przeciwni są Hejdysz i in. (2018), którzy proponują w mieszankach jako alternatywę takie gatunki jak *L. albus* i *L. luteus*. W paszach treściwych dla krów mlecznych oraz opasów udział łubinu powinien oscylować na poziomie 10-20 %. Niezalecane jest dodawanie roślin strączkowych do pasz dla cieląt [Dzwonkowski 2016].

W ostatnich latach można zaobserwować znaczące zmiany w nawykach żywieniowych ludzi. Jest to związane z postępowaniem technologicznym, powszechnym dostępem do wiedzy i

większą świadomością konsumentów, ponieważ coraz więcej osób zaczyna dostrzegać, jak ogromne znaczenie ma to, co jemy. Dieta jest kluczowa nie tylko w sytuacji walki z chorobą, ale stanowi ważną część profilaktyki. Coraz częściej zwraca się uwagę nie tylko na cenę, ale również, na jakość produktów [Siuba-Strzelińska 2019]. Rośnie znaczenie żywności funkcjonalnej, która dzięki wartościom odżywczym i substancjom czynnym pozytywnie wpływa na zdrowie i dobre samopoczucie każdego z nas. Łubin bardzo dobrze wpasowuje się w definicję żywności funkcjonalnej [Krawczyk i Mrówczyński 2012, Sipsas 2008]. Nasiona łubinu mają zastosowanie w piekarnictwie, cukiernictwie czy przemyśle mięsnym. Jest to alternatywa nie tylko dla diabetyków, ale również dla osób z nietolerancją glutenu czy wegetarian [Lampart – Szczapa i Czubiński 2011, Lampart- Szczapa i Łoza 2007, Lammi i in. 2016, Sipsas 2008]. Zielińska-Dawidziak oraz Lampart-Szczapa (2017) sugerują, aby łubin wykorzystywać do produkcji żywności dla sportowców, osób cierpiących na otyłość, cukrzycę czy też choroby układu krążenia. Badania przeprowadzone przez Alarcon i in. (2020) miały na celu sprawdzenie wpływu trzech gatunków łubinu (żółtego, białego i wąskolistnego) na choroby układu krążenia. Według badań to właśnie choroby układu krążenia są najczęstszą przyczyną zgonów na świecie. Wyniki pokazały, że ekstrakt z trzech gatunków łubinu działa korzystnie na płytki krwi, ogranicza cholesterol, utrzymuje stały poziom insuliny i ciśnienia krwi.

4. Kierunki hodowli *Lupinus angustifolius* L.

Jednym z najważniejszych zadań, przed jakim stoją hodowcy łubinu jest otrzymanie stabilnego i wysokiego plonu w zmieniających się wciąż warunkach środowiskowych. Stale kształtujące się trendy w produkcji rolnej oraz oczekiwania rynku, są powodami poszukiwania odmian, które korzystnie plonują, są odporne na większość chorób oraz czynników abiotycznych.

Prowadzone prace hodowlane i bogaty materiał wyjściowy *L. angustifolius* L. pozwoliły na uzyskanie roślin o następujących cechach: tolerancja na opóźniony siew, zdeterminowany wzrost, wczesność dojrzewania, niepęknięcie strąków, poprawienie cech jakościowych nasion (zawartość alkaloidów i białka) oraz odporność na choroby takich jak fuzarium i częściowo antraknozę [Boros i Stawiński 2012, Świąciecki 2017].

Niezmiennie, istotnym aspektem w hodowli jest plenność. Według GUS w 2018 roku w Polsce zebrano na nasiona średnio 17,7 dt/ha plonu roślin strączkowych. Największy konkurent łubinu wąskolistnego – groch, który do roku 2014 posiadał najwięcej

zarejestrowanych odmian, w roku 2021 dał plon 42,0 dt/ha. Z kolei według danych COBORU w 2021 roku zebrano 23,5 dt/ha nasion łąbinu wąskolistnego. Najlepiej plonujące w 2021 roku odmiany *L. angustifolius* L. niesamokończące niskoalkaloidowe to: Koral, a tuż za nim Agat i Swing. W grupie odmian samokończących niskoalkaloidowych znajdują się: Homer, Regent oraz Szot.

W celu osiągnięcia wysokiego plonu, hodowcom, udało się uzyskać odmiany o niepękających strąkach. Dużym problemem jest utrzymanie na wystarczającym poziomie zawiązywania strąków. Dotyczy to zwłaszcza szczytowych części kwiatostanów [Galek i in. 2004]. Łubin należy do gatunku, który kwitnie obficie, ale zdarza się, że liczba strąków jest znacząco mniejsza niż liczba wykształconych kwiatów. Prusiński i Borowska (2003) podają jako przykład łubin żółty, w przypadku którego udział zebranych strąków w stosunku do liczby powstałych kwiatów wynosił 25 %. Galek i in. (2004) twierdzą, że przyczynami mogą być: brak odpowiednich składników pokarmowych, niewystarczająca wilgotność lub złe warunki meteorologiczne podczas kwitnienia. Zespół skupił się na zbadaniu braku zawiązywania strąków oraz ocenił płodność wybranych odmian łąbinu wąskolistnego. Badacze ustalili, że formy samokończące charakteryzowały się znacznie lepszym indeksem płodności niż te, o tradycyjnym typie wzrostu. Na podstawie obserwacji cytologicznych, wykazali, że osadzanie pyłku jest gorsze w górnej części kwiatostanu.

Do samoczynnego pęknięcia strąków i osypywania nasion (nawet 80-100%) mogą przyniwać się również suche i gorące lata [Boros i Stawiński 2012]. Jak do tej pory w hodowli udało się, w dużej mierze wyeliminować pęknięcie strąków. Prowadzone badania pozwoliły na identyfikację dwóch genów *tardus* oraz *lentu*. Pierwszy gen odpowiada za wzmocnienie szwu znajdującego się pomiędzy ścianami strąka. Drugi z kolei wpływa na elastyczność ścian powodując zmniejszenie siły skrętu po wyschnięciu, a tym samym ogranicza pęknięcie strąka [Li i in. 2012]. Oba geny działają niezależnie od siebie, ale połączenie ich obu umożliwiłoby otrzymanie roślin o niepękających strąkach i w efekcie zwiększyło plon. W Polsce udało się otrzymać kilka odmian (np. Homer, Roland, Neron), które pozwoliły na ograniczenie strat podczas dojrzwania i zbiorów [Boros i Stawiński 2012, COBORU 2022, Świącicki i Świącicki 1995, Świącicki i in. 1997].

Odporność na stesy abiotyczne i biotyczne to istotne elementy strategii hodowli łąbinu wąskolistnego. Susza to jeden z czynników środowiskowych, który ma wpływ na wartości pokarmowe oraz jakość i stabilność plonu. Niestety łąbin należy do roślin słabo odpornych na ten czynnik abiotyczny, szczególnie w fazie wschodów oraz podczas kwitnienia [Juzoń i in. 2012]. Kalandyk i in. (2017) badali wpływ zasolenia oraz tolerancję na suszę łąbinu żółtego,

łubinu białego i grochu siewnego. Okazało się, że zasolenie gleby silnie wpływa na kwitnienie. Jednak na etapie zawiązywania strąków, to właśnie łubin żółty cechował się najmniejszą wrażliwością na zasolenie spośród badanych obiektów. Kalandyk i in. (2017) badali tolerancję suszy poprzez ograniczenie wody u dwóch odmian łubinu wąskolistnego (Graf i Regent). W swojej pracy sprawdzali wpływ stresu na procesy fizjologiczne i czy ten czynnik może rzutować na następne pokolenia. Opublikowane badania pokazały, że rośliny potomne, które wyprodukowano z nasion poddanych działaniom stresowym były bardziej tolerancyjne na suszę i dawały większy plon niż te, które wyhodowano w tradycyjny sposób. Podobne spostrzeżenia mieli Rizhsky i in. (2002), którzy wcześniej niż Kalandyn i in. zajęli się czynnikami abiotycznymi u roślin. Wykazali, że susza i temperatura mogą rzutować na zmiany morfologiczne, fizjologiczne oraz biochemiczne w roślinach potomnych.

W czasie prowadzenia doświadczeń nad odmianami łubinów, hodowcy dążą do uzyskania informacji o tym, jak zachowują się genotypy w różnych rejonach uprawy. Istotna jest interakcja genotypowo – środowiskowa, która pozwala na wyselekcjonowanie odmian najbardziej stabilnych. Takie rośliny charakteryzują się dobrym plonowaniem we wszystkich możliwych środowiskach [Annicchiarico i in. 2015, Bujak i in. 2006]. Talhinhos in. (2006) sprawdzali wpływ środowiska na cechy morfologiczne *L. angustifolius* w różnych rejonach Portugalii. Badacze dowiedli, że położenie geograficzne może wpłynąć znacząco na rozwój roślin. Łubiny uprawiane na północy charakteryzowały się późnym rozwojem wegetacyjnym, ale dużymi nasionami. Z kolei łubiny rozmieszczone na terenach południowych kwitną szybciej, ale wydają mniejsze nasiona.

Duże znaczenie ma również termoneutralność, szczególnie w chłodniejszych rejonach, gdzie okres wegetacyjny jest krótszy w stosunku do południowych i południowo- wschodnich rejonów Polski. Dzięki wprowadzeniu do łubinu tej cechy jest możliwe obniżenie ryzyka niższego plonu czy porażenia roślin przez choroby [Podleśny i Podleśna 2010, Stawiński i in. 1997].

W dalszym ciągu, łubin wąskolistny narażony jest nie tylko na czynniki abiotyczne, również na choroby. Jednym z priorytetów dla hodowców jest poszukiwanie form odpornych na antraknozę. To jedna z groźniejszych chorób powodowana przez grzyb *Colletotrichum lupini*, przy której porażone rośliny wyglądają na uschnięte, a na łodygach widoczne są różowo-łososiowe plamy z brunatnym obrzeżem. Porażeniu mogą też ulec zarówno strąki jak i nasiona. Czynnikiem sprzyjającym chorobie jest deszcz i wysoka wilgotność [Jędrzycka i Kaczmarek 2012, Yang i in. 2004]. Horoszkiewicz-Janka i in. (2011) twierdzą, że łubin wąskolistny uważany jest za gatunek o większej odporności na antraknozę niż łubin żółty czy

biały. Również groźną chorobą jest fuzaryjne wędniecie łubinów wywoływane przez przez *Fusarium oxysporum f.sp. lupini* [Horoszkiewicz – Janka i in. 2011]. Najczęstszą przyczyną występowania tej choroby u łubinu wąskolistnego jest nadmierna wilgotność i niska temperatura lub mała wilgotność i wysoka temperatura [Podleśny i in. 2016].

5. Wykorzystanie kultur *in vitro* dla doskonalenia *L. angustifolius* L. w odniesieniu do innych gatunków z rodzaju *Lupinus*

5.1. Mikrorozmnażanie *Lupinus angustifolius* L. oraz innych przedstawicieli *Lupinus*

Zastosowanie techniki *in vitro* w hodowli łubinów może przyczynić się do zarządzania zmiennością genetyczną oraz przyspieszenia procesów tradycyjnej hodowli [Galek 2010, Prusiński 2015]. W przeciągu kilkudziesięciu lat rozwoju kultur tkankowych wiele zespołów badawczych podejmowało próby uzyskania regeneracji łubinów z różnych eksplantatów wyjściowych (Tabela 1). Do tej pory tkankę kalusową udało się uzyskać z całych eksplantatów liści i korzeni u takich gatunków jak: *L. luteus*, *L. angustifolius*, *L. polyphyllus* czy *L. mutabilis*. Prekursorem tworzenia eksplantatów roślinnych z kalusa był Sator (1985). Dodana przez niego do podłoża kombinacja regulatorów wzrostu z grupy auksyn i cytokinin (IAA oraz BA) spowodowała u *L. angustifolius* i *L. polyphyllus* regenerację w struktury wielopędowe. Natomiast *L. albus* i *L. luteus* w tych samych warunkach wykształciły tylko struktury jednopędowe. Wpływ regulatorów wzrostu na rośliny w kulturach *in vitro* badali również Upadhyaya i in. (1992). Z *L. texensis* pobrano fragment hipokotyłu i wyłożono na pożywkę MS z dodatkiem BA, Kin oraz NAA. W rezultacie z eksplantatów wykształciły się nowe pędy, natomiast na podłożu z dodatkiem NAA dodatkowo można było zaobserwować u 14 % eksplantatów wytworzenie korzeni. Przeprowadzone doświadczenie Upadhyaya i in. (1992) dały nowe możliwości badawcze w kierunku kultur tkankowych i prawidłowej regeneracji eksplantatów w rośliny (Tabela 1).

Rybczyński i Podyma (1993) oraz Rahim i Caliagari (1996) w swoich doświadczeniach użyli kilkudniowe siewki różnych gatunków. Zespół pierwszy wykorzystał *L. albus*, *L. luteus*, *L. angustifolius*, *L. hispanicum*, *L. polyphyllus* natomiast Rahim i Caliagari *L. mutabilis*. W badaniach Rybczyńskiego i Podymy eksplantaty wyłożono na zmodyfikowane podłoże B5. Z kolei zespół drugi zastosował podłoże MS z dodatkiem TDZ. W jednym i drugim eksperymencie uzyskano wielopędowe sadzonki, natomiast nieliczne eksplantaty *L. mutabilis* wykształciły korzenie.

Ostatnie 20 lat pracy w kulturach tkankowych to próba osiągnięcia organogenezy za pomocą modyfikacji podłoża hodowlanych dla różnych gatunków z rodzaju *Lupinus*.

W 2002 roku Pniewski i Kapusta do mikrorozmnazania wykorzystali nasiona czterech gatunków łubinów: *L. luteus*, *L. angustifolius*, *L. mutabilis* oraz *L. albus*. Zmodyfikowana przez nich pożywka podstawowa MS (Tabela 1) z dodatkiem BAP, IAA, IBA oraz NAA pozwoliła na uzyskanie wielopędowych sadzonek u wszystkich gatunków. Zespół badawczy Galek i in. (2010) wykorzystali merystemy *L. mutabilis* i *L. termis*, które wyłożono na różne kombinacje pożywki B5. U eksplantatów *L. termis* na pożywce B5 z dodatkiem IBA można było zaobserwować pełną morfogenezę. Również u *L. mutabilis* odnotowano pełną morfogenezę oraz intensywne formowanie się tkanki kalusowej [Galek i in. 2010].

Z uwagi na trudności w regeneracji u łubinu białego, grupa badaczy Aslam i in. (2020) podjęła się stworzenia protokołu indukcji roślin. Pobrane węzły liścieni z pięciodniowych siewek wyłożono na zmodyfikowane przez nich podłoże hodowlane (M519) z dodatkiem kinetyny, BAP i NAA. Badaczom udało się uzyskać 80 % regenerację eksplantatów na pożywce M519 z dodatkiem NAA. Dodatkowo zwiększona zawartość węgla aktywnego w podłożu spowodowała ograniczenie występowania brązowych przebarwień u eksplantatów i wydłużenie pędów. Z kolei Hamza (2013) badał *L. termis* pod kątem mikrorozmnazania i tworzenia się tkanki kalusowej. Do podstawowej pożywki MS dodał różne dawki ekstraktu z drożdży (Tabela 1). Po czterech tygodniach od założenia kultury zaobserwowano jedynie znaczący wzrost roślin oraz zwiększenie masy w liścieniach. Dodatkowo ekstrakt z drożdży ograniczył zawartość związków fenolowych w liścieniach.

Na uwagę zasługuje również hodowla wyizolowanych zarodków i zapylnych zalążków w kulturach *in vitro* [Zenkteler 2007]. W kulturze zarodków ważny jest dobór podłoża hodowlanego, obniżenie ciśnienia osmotycznego oraz zastosowanie odpowiednich regulatorów wzrostu w czasie prowadzenia kultury. W przypadku podłoża hodowlanego zarodki są umieszczane na pożywce agarowej, płynnej lub na specjalnych mostkach bibułowych umieszczanych w płynnym podłożu [Schäfer – Menuhr i in. 1988, Vuillaume i Hoff 1986, Podyma i in. 1988, Kasten i Kunert 1991]. Na pożywce agarowej bez regulatorów wzrostu zostały umieszczone zarodki *L. mutabilis* i *L. albus*, które się nie rozwijały. Dopiero po umieszczeniu na mostkach z bibuły w płynnej pożywce i pożywce z 0,5 % agarem zaobserwowano wzrost [Vuillaume i Hoff 1986]. Z kolei Schäfer- Menuhr (1988) stwierdził, że zastosowanie w pierwszych dniach hodowli regulatorów wzrostu, korzystnie wpływa na wzrost rośliny. Po wyłożeniu zarodków mieszańcowych, z osiemnastodniowych strąków, *L. mutabilis* oraz *L. hartwegii* otrzymano kalusy, które były dobrą prognozą do

dalszych badań. Przyborowski i Packa (1997) stwierdzili, że optymalnym terminem na izolację zarodków jest czas pomiędzy 10 a 15 dniem po zapyleniu.

Próby nad zarodkami mieszańcowymi podjęli Przyborowki i Wiwart (1997). Wprowadzili oni do kultur *in vitro* wyizolowane, niedojrzałe zarodki pochodzące z krzyżowania *L. angustifolius* x *L. albus* i *L. albus* x *L. angustifolius*. Tak jak Kasten i Kunret (1991) przeanalizowali i wybrali do badań trzy gatunki łubinów: *L. angustifolius*, *L. luteus*. oraz *L. hartwegii*. Opracowali oni metodę hodowli niedojrzałych embrionów i opisać charakterystykę morfologiczną i biochemiczną mieszańców. Badania były podstawą do dalszych prac nad zarodkami. Poprzez krzyżowanie *L. angustifolius* z *L. luteus* otrzymali rośliny mieszańcowe F1 i potwierdzili teorię, że jest możliwe wygenerowanie mieszańców międzygatunkowych dwóch gatunków Starego Świata [Kasten i in. 1991].

5.2. Krzyżowanie oddalone- otrzymywanie mieszańców w rodzaju *Lupinus*

Krzyżowanie roślin to podstawowa technika hodowlana, która poprzez połączenie form rodzicielskich z pożądanymi cechami prowadzi, po zastosowaniu odpowiedniej selekcji wśród uzyskanych rekombinantów, do wyprowadzenia nowej odmiany rośliny użytkowej. Najczęściej krzyżowanie odbywa się w obrębie gatunku, przy wykorzystaniu już istniejących odmian oraz rodów czy linii hodowlanych rodzimej lub zagranicznej hodowli.

Metoda krzyżowanie oddalonego jest ważnym elementem programów hodowlanych roślin zbożowych min. pszenicy, pszenżyta czy owsa. Dzięki tej technice możliwe jest poszerzenie zmienności genetycznej przydatnej w hodowli [Gruszecka 2006, Kozhahmetov i in. 2014, Leśniowska- Nowak i in. 2021]. Tradycyjna uprawa pozwoliła na otrzymanie wielu odmian, ale stale zmieniający się wpływ czynników abiotycznych i biotycznych spowodowały przyspieszenie prac hodowlanych i otrzymanie, w krótkim czasie, roślin o pożądanym cechach. Przykładem są badania prowadzone przez Leśnikowska- Nowak i in. (2021). Badacze szukali nowych źródeł odporności pszenżyta na czynniki abiotyczne u dzikich gatunków roślin oraz próbowali pracować protokół krzyżowania z mrozoopornymi roślinami z rodzaju *Leymus*.

Dzięki krzyżowaniu roślin strączkowych i selekcji pożądanym rekombinantów otrzymujemy około 75% odmian uprawnych [Martyniak 2000]. Wśród gatunków, u których wykorzystuje się w.w. metodę jak groch czy fasola. Jednak w literaturze nie ma obszernych badań poświęconej tej rodzinie, z uwagi na trudności w uzyskaniu roślin haploidalnych [Hooghvorst i in. 2020]. Prowadzone programy hodowlane koncentrują się na uzyskaniu form

niskoalkaloidowych, o wysokiej zawartości białka i tłuszczu, a także odporności na choroby [Przyborowski i Packa 1997]. Jednak powodzenie w hodowli zależy od układu krzyżowań. Hodowcy roślin strączkowych posługują się materiałem z istniejącej już odmiany oraz materiałem form dzikich, które łączą z odmianami uprawnymi. Taki zabieg ma na celu wprowadzenie cech jakościowych i odporności nie tylko na choroby, ale również na warunki środowiskowe (np. tolerancja na suszę) [Sosnowska 2011, Martyniak 1998]. W przypadku łąbinu materiałem wyjściowym są gatunki pochodzące ze Starego lub z Nowego Świata. Mimo postępu w hodowli łąbinu, nadal prowadzone są badania z wykorzystaniem krzyżowań, w celu stworzenia atrakcyjniejszych form o poszerzonej zmienności genetycznej [Sawicka-Sienkiewicz i in. 2006].

Pierwsze badania dotyczące krzyżowania w obrębie rodzaju *Lupinus* przeprowadził Fruwith na początku XX wieku [Gladstones 1998]. W Polsce hodowcy skupili się na krzyżowaniu wewnątrzgatunkowym. Po skrzyżowaniu wczesnej odmiany Różowy Pastewny (*L. angustifolius*) z formą dziką *L. linifolius* otrzymano odmianę Ignis. To właśnie ta odmiana była podstawą do dalszych krzyżowań z liniami wczesnymi. Zwieńczeniem prac było uzyskanie odmian: Emir, Mirela oraz Kazar [Święcicki i in. 1997]. W wyniku skrzyżowania dwóch form *L. albus* z *L. vavilovi* powstała odmiana łąbinu białego o nazwie Wat. Wyhodowana forma pastewna ze względu na wysoki plon nasion była cenną odmianą dla rolników [Koprowicz i Święcicki 1985].

Niestety u łąbinu krzyżowanie międzygatunkowe jest utrudnione ze względu na bariery cytologiczne [Rybczyński 2001, Williams i in. 1980]. Mieszańce można uzyskać w obrębie grupy, która posiada 48 chromosomów. Brak homologii chromosomów u gatunków, które dotychczas krzyżowano, prowadzi do redukcji koniugacji i *crossing-over* między chromosomami. Krzyżowanie międzygatunkowe tym bardziej utrudnione im większe oddalenie genetyczne osobników, które poddano krzyżowaniu [Galek 2010, Szota 1997]. Jednak bariery cytogenetyczne mogą być przełamane. Udało się to Sawickiej – Sienkiewicz i Brejda (1999), które poprzez krzyżowanie gatunków z sekcji *Albus* uzyskały żywotne rośliny. Z sukcesem skrzyżowano też gatunki *Luteus polyphylus* z *L. mutabilis*, co dało rośliny mieszańcowe [Baer von E. 2004].

Niezgodności genetyczne mogą objawiać się na każdym etapie podczas cyklu otrzymywania mieszańców oddalonych i ich dalszego rozmnażania. Istnieje wiele barier uniemożliwiających lub utrudniających otrzymywanie mieszańców. Bariery izolacyjne, związane z rozbieżnymi terminami kwitnienia można ominąć, największe problemy jednak sprawiają bariery prezygotyczne i postzygotyczne [Kazimierski 1961, Kazimierska 1970,

Zenkter 2007]. Bariery prezygotyczne utrudniają zapłodnienie i uniemożliwiają pojawienie się zygoty. Pyłek może w ogóle nie kiełkować na znamieniu, wytworzona łagiewka nie może dotrzeć do komórki jajowej. Zbyt długi słupek może też być przeszkodą dla krótkiej łagiewki pyłkowej [Zenkter 2007]. Bariery prezygotyczne rozpatrywano u wielu gatunków łubinu, w badaniach nad krzyżowaniem gatunków takich jak: łubin biały, wąskolistny, żółty czy andyjski.

Bariery prezygotyczne można próbować obejść dzięki traktowaniu słupek wysoką temperaturą lub promieniami X, naniesieniem na słupek mieszanki zgodnego i niezgodnego pyłku czy odcięciem znamion [Sosnowska 2011].

W przypadku zaś bariery postzygotycznej problemy występują na etapie od syngamii do powstania dojrzałego zarodka. Zakłócenia prawidłowego rozwoju we wczesnym stadium mogą być przyczyną zamierania zarodka. Stwierdzono również trudności przy niewłaściwym kiełkowaniu niedorozwiniętych nasion i braku ich żywotności w pokoleniu F1 [Przyborowski i Packa 1997, Williams i in. 1980].

5.3. Techniki otrzymywania roślin haploidalnych

Techniki haploidyacji wykorzystywane i stosowane do uzyskiwania u roślin homozygotycznych linii opierają się przede wszystkim o cztery podstawowe procesy biologiczne: partogenezę, eliminację chromosomów, androgenzę *in vitro* i gynogenezę *in vitro*. Proces otrzymywania linii homozygotycznych poznano między innymi u bielunia, jęczmienia, ryżu, tytoniu, rzepaku, pszenicy [Foster i in. 2007]. Równoległe z badaniami podstawowymi następowało praktyczne wykorzystanie podwojonych haploidów w programach hodowlanych różnych gatunków uprawnych [Małuszyński i in. 2003, Foster i in. 2007].

Metoda oparta na eliminacji chromosomów opiera się o krzyżowanie oddalone, które przeprowadzane jest w warunkach *in vivo*, a następnie otrzymane zarodki przenoszone są w odpowiednim stadium rozwoju do warunków *in vitro*. W wyniku krzyżowania form oddalonych dochodzi do eliminacji chromosomów u zarodka mieszańcowego, który w efekcie finalnym reprezentuje genotyp mateczny. Technika ta jest z powodzeniem stosowana do indukcji linii haploidalnych u jęczmienia i pszenicy, a następnie przez podwojenie liczby chromosomów prowadzi do otrzymywania linii DH na szeroką skalę [Pluta i in. 2013, Sosnowska i in. 2011].

W procesie androgenezy *in vitro* mikrospory, pozostające w pylnikach lub z nich wyizolowane, pobudzane są do przekształcenia się w struktury wielokomórkowe (embrioidy). Dalej z nich, poprzez androgeniczne zarodki lub kalus, różnicują się haploidalne rośliny. Gynogeneza i indukowana partenogeneza to procesy przebiegające bez udziału zapłodnienia, w których rozwój haploidalnych zarodków ma miejsce bezpośrednio z komórek gametofitu żeńskiego posiadającego zredukowaną liczbę chromosomów. Gynogeneza *in vitro* bazuje na izolacji niezapłodnionych zalążków, zawierających komórki haploidalne, z których można wyprowadzić haploidalne rośliny.

Indukowana partenogeneza polega na indukowaniu niezapłodnionych haploidalnych komórek jajowych do rozwoju zarodka. Jako induktory takiego rozwoju zarodka *in vivo* stosowane są: pyłek innego gatunku lub rodzaju, pyłek tego samego rodzaju o różnej ploidalności oraz pyłek pochodzący od rodzimego bądź obcego gatunku czy rodzaju posiadający zdolność do zapylenia, ale pozbawiony możliwości zapłodnienia. Wśród czynników wykorzystywanych do zmiany właściwości pyłku przez użycie chemicznych lub fizycznych inaktywatorów należy wyróżnić: niską oraz wysoką temperaturę, promieniowanie jonizujące (X, UV, γ), błękit toluidyny, podtlenek azotu czy formaldehyd [Przyborowski 1994]. Zarodki w odpowiednim momencie muszą zostać przeniesione do warunków *in vitro*, w celu zapewnienia im dalszego prawidłowego rozwoju w roślinę haploidalną.

W badaniach nad przebiegiem efektywnej indukcji roślin haploidalnych zwraca się szczególną uwagę na genotyp rośliny donorowej, warunki jej wzrostu przed pobraniem materiału do kultur *in vitro*, czynniki stresujące - fizyczne bądź chemiczne stosowane na etapie wstępnym przed wprowadzeniem materiału do kultury *in vitro*. Istotną rolę odgrywa skład pożywki oraz warunki fizyczne kultury (temperatura, światło) [Czaplicki 2006, Kozak 2012].

Praktyczne wykorzystanie haploidów w badaniach genetycznych, cytogenetycznych, czy mutacyjno-selekcyjnych oraz w hodowli twórczej jest związane ze skuteczną diploidyzacją. Diploidyzacja może następować spontanicznie lub może być wywoływana sztucznie. Spontaniczne podwojenie polega na samorzutnym powstawaniu komórek somatycznych o diploidalnej liczbie chromosomów lub wytwarzaniu gamet o niezredukowanej liczbie chromosomów. Sztuczna diploidyzacja polega najczęściej na stosowaniu różnych związków chemicznych (kolchicyna, oryzalina, trifluoralin, kofeina). W wyniku podwojenia liczby chromosomów u roślin haploidalnych otrzymuje się linie DH (Double Haploids) w ciągu roku lub dwóch lat. Taki sam stopień homozygotyczności

metodami konwencjonalnymi uzyskuje się po kilku latach. Wyselekcjonowane linie DH są także doskonałym materiałem do badań nad lokalizacją QTL.

5.4. Androgeniza w rodzaju *Lupinus*.

Jak do tej pory wszystkie podjęte próby uzyskanie roślin haploidalnych u *Fabaceae* kończyły się na etapie wstępnych badań. Wykorzystując metody androgenyzy udało się otrzymać pojedyncze rośliny haploidalne. Niestety sukces ten odnotowano tylko u kilku gatunków spośród wszystkich przedstawicieli rodziny bobowatych [Croser i in. 2006]. Pionierami w uzyskaniu kalusa poprzez kulturę pylników u grochu zwyczajnego (*Pisum sativum*) byli Gupta i in. (1972). W rodzaju *Lupinus* podejmowane były próby indukcji haploidów również w kulturach pylnikowych oraz izolowanych mikrospor, ale kończyły się tylko otrzymaniem wielokomórkowych struktur prazarodków [Caligari i Omerod 1994, Cambos i Andrada 1994, Galek i in. 2006, Skrzypek i in. 2008 Kozak i in. 2012].

Szybkie otrzymanie linii homozygotycznych może pomóc w uzyskaniu nowych odmian łubinów. Efektywność androgenyzy to nie tylko dobór właściwej metody indukcji, ale również stan fizjologiczny roślin i właściwie dobrany materiał genetyczny [Czaplicki 2006]. Przeprowadzone badania na roślinach zbożowych dowiodły, że temperatura oraz światło mają znamieny wpływ na kondycję rośliny, z której pobierany jest materiał. Zastosowanie stresu termicznego poprzez obniżenie temperatury, odpowiednie podłoże hodowlane czy źródło węgla mają istotne znaczenie w wywoływaniu reakcji androgenicznych [Czaplicki 2006]. Stres u rośliny można wywołać poprzez głód azotowy, chemiczne traktowanie kwiatostanów lub zastosowanie krótkiego dnia i niskiej temperatury. Najczęściej pylniki utrzymuje się w temperaturze ok. 4-5 °C od trzech do czternastu dni [Kyo i Harada 1986, Lazar i in. 1990, Rodrigues i in. 2005]. W przypadku łubinu wąskolistnego pąki chłodzi się w temperaturze 4°C [Skrzypek i in. 2008, Kozak i in. 2012]. W pracy Kozak i in. 2012 stwierdzono zależność kolorów pylników od pożądanego stadium mikrospor. Do indukcji kalusa stosuje się min. podłoże hodowlane B5 (Gamborg 1986), BC (Blaydes 1996), C17 (Wang i Chen 1983) czy MS (Murashige i Skoog 1964). W przypadku łubinu wąskolistnego do indukcji najczęściej używanymi pożywkami są N&N (Nitsch i Nitsch 1969) i MS (Murashige i Skoog 1964) [Simioniuc i in. 2010, Kozak i in. 2012, Skrzypek i in. 2008]. Oprócz podłoża hodowlanego niezbędnym elementem przy indukcji jest stosowanie źródła węgla w formie sacharozy, maltozy lub glukozy. Jony NO_3^- i NH_4^+ zawarte w odpowiedniej proporcji w pożywce pozwalają na indukcję oraz regenerację materiału roślinnego.

Prekursorem uzyskania kalusa z pylników był Sator, który w 1985 roku prowadził badania na *L. polyphyllus*. Do pożywki MS dodał kombinacje regulatorów z grupy auksyn i cytokinin takich jak: NAA, 2,4 D, IAA czy BAP. Bayliss i in. (2004) wyizolowali mikrospory z trzech gatunków łubinów: białego, żółtego oraz wąskolistnego, których następnie użyli do indukcji androgenezy. Za pomocą szoku termicznego i ograniczeniu sacharozy chcieli doprowadzić do embriogenezy. Pąki kwiatowe pobrane z wyżej wymienionych. gatunków łubinów poddano traktowaniu termicznemu: schłodzono je w 4 °C przez 72 h, a następnie hodowano w 32 °C przez 24 h. Wyizolowane z pąków mikrospory zostały wyłożone na zmodyfikowane podłoże N&N (Nitsch i Nitsch 1969) i B5 (Gamborga 1986) z dodatkiem 2% sacharozy. Z wyizolowanych mikrospor udało się uzyskać struktury komórkowe. Ormerod i Caligari (1994) wykorzystali pylniki i mikrospory łubinu białego, które zostały wyłożone na zmodyfikowane podłoże N&N (Nitsch i Nitsch 1969) uzupełnione witaminami z pożywki B5 (Gamborga 1986) oraz aminokwasami: l- proliną i l- seryną. Jako pierwsi też oprócz auksyn i cytokinin dodali do podłoża giberelinę (GA₃), aby pobudzić mikrospory do indukcji. W rezultacie udało im się uzyskać zarodki, które powstały z dwujądrowych mikrospor. O krok dalej w badaniach poszli Skrzypek i in. (2008), którzy z tych samych gatunków co Bayliss pobrali materiał do androgenezy. Materiał wyjściowy stanowiły pąki kwiatowe, które również poddano traktowaniu termicznemu: 4 °C przez dwa do pięciu dni lub 32 °C przez jeden do trzech dni. Z pąków wyizolowano mikrospory, które przeniesiono na zmodyfikowaną płynną pożywkę N&N (Nitsch i Nitsch 1969) i B5 (Gamborga 1986) (Tabela 2). Do indukcji kalusa zastosowano podłoża: MS (Murashige i Skoog 1964), S&H (Schenk i Hildebrandt 1972), B5 (Gamborga 1986) i NNB5, które uzupełniono różnymi układami regulatorów wzrost (Tabela 2). Kulturę prowadzono w ciemni w temperaturze 25 – 30 °C. Po kilku tygodniach udało się zaindukować kalus. Próba otrzymania rośliny z uzyskanych kalusów nie powiodła się.

Sukces androgenezy zależy od prawidłowego doboru pąków w odpowiednim stadium rozwojowym mikrospor [Kozak i in. 2012]. Kozak i in. (2012) przedstawili badania łubinu wąskolistnego pod względem charakterystyki wielkości pąków oraz rozmiaru i koloru pylników optymalnych do indukcji androgenezy. Ponadto, badano wpływ traktowania termicznego i składu podłoża na indukcję embriogenezy. Kozak i in. (2012) podkreślają, że najlepszym parametrem udanej indukcji są pylniki pobierane ze środkowej części pąka, ponieważ zlokalizowanych jest tam najwięcej komórek w stadium jednojądrowym. Zebrane pąki podzielono na dwie części. Jedną część poddano traktowaniu termicznemu (4 °C przez cztery dni) zaś drugą pozostawiono bez traktowania i przeznaczono do dalszych procesów. Do badań wykorzystano podłoże MS z dodatkiem regulatorów wzrostu o różnych stężeniach

(Tabela 2). Pylniki po wyłożeniu na pożywkę inkubowano w ciemności przez 28 dni w 24 °C. Po trzech tygodniach od rozpoczęcia hodowli udało się zaobserwować kalus na pylnikach wyłożonych na podłożu MS z dodatkiem 2,4 D i Kin. Uzyskane kalusy miały biały kolor i były zwarte. Jednak po miesiącu na pożywce regenerującej MS z NAA i BA zaobserwowano brązowienie a następnie obumarcie wszystkich wytworzonych kalusów. Galek i in. (2019) ponowili badania indukcji androgenezy wykorzystując dwa genotypy *L. angustifolius* (Karo i Graf). Otrzymane wyniki potwierdziły doniesienia zarówno Kozak i in. z 2012 jak i innych badaczy [Skrzypek 2008, Bayliss i in. 2004]. Jak do tej pory nie udało się jednak uzyskać roślini haploidalnych oraz diploidalnych.

V. Materiały i metody

1. Doświadczenie polowe

1.1. Materiał badawczy

Materiał do badań stanowiły linie RILs łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.), pochodzące z kolekcji Katedry Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Materiał uzyskano ze skrzyżowania linii epigonalnej Lae-1 oraz odmiany Emir o tradycyjnym typie wzrostu w roku 2002, a następnie były one poddane kilkuletniemu procesowi homozygotyzacji. Do badań wykorzystano pokolenie F12.

1.2. Metody – doświadczenie polowe - ocena zmienności fenotypowej linii RILs łubinu wąskolistnego pod względem cech użytkowych

Badania polowe obejmowały trzyletni cykl, w latach 2016-2018, który przeprowadzono w Stacji Hodowli Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, Oddział Przebudowo. Doświadczenie założono na glebie zaliczanej do klasy bonitacyjnej IIIa. Wszystkie zabiegi uprawowe i pielęgnacyjne przed wykonaniem siewu zostały dostosowane do agrotechniki łubinu. Przed wysiewem nasiona zaprawiono preparatem grzybobójczym ‘Funaben T’. Nasiona (Tabela 3) wysiano poletkach o powierzchni 3,9 m² w rozstawie 20 x 10 cm. Genotypy były randomizowane losowo.

W czasie okresu wegetacyjnego określono barwę kwiatów oraz pokrój rośliny (Tabela 3). Pod koniec okresu wegetacyjnego przeprowadzono ocenę linii łubinu wąskolistnego na każdym poletku pod względem wybranych cech morfologicznych i elementów struktury plonów. Wykonano pomiary 8 losowo wybranych roślin z danego poletka, nie uwzględniając roślin brzeżnych.

Na podstawie pomiarów określono takie cechy jak:

- wysokość pędu głównego (cm),
- wysokość całej rośliny (cm),
- liczbe rozgałęzień produktywnych bocznych (szt.),
- długość kwiatostanu pędu głównego (cm),
- długość kwiatostanu pędu bocznego (cm),
- liczba okółków na pędzie głównym (szt.),
- liczba okółków na pędzie bocznym (szt.),

Dodatkowo określone zostały elementy struktury plonu:

- liczba zawiązanych strąków z pędu głównego (szt.),
- liczba zawiązanych strąków z pędu bocznego (szt.),
- plon z poletka (kg),
- masę 1000 nasion (g),
- zawartości białka i tłuszczu (%) w nasionach

Zawartość procentowa białka oraz tłuszczu w nasionach była określana co roku przy pomocy urządzenia Infratec (Perten Instrumente) znajdującego się w Małopolskiej Stacji Hodowli Roślin, Oddział Kobierzyce. Urządzenie podlegało corocznej kalibracji a pomiary wykonano w jednym powtórzeniu.

1.3. Warunki klimatyczne

Dane meteorologiczne obejmowały trzy sezony wegetacyjne (2016 – 2018) uzyskane ze Stacji Meteorologicznej Przebędowo. Sumę opadów oraz temperaturę z trzech lat badań przedstawiono na Wykresie: 1a, 1b oraz 1c. Określono również współczynnik hydrotermiczny Sielianinowa (Tabela 4a) na podstawie wzoru: $K = 10 P / S t$, gdzie :

K- współczynnik hydrotermiczny Sielianinowa

P – suma opadów w rozpatrywanym sezonie wegetacyjnym (mm),

S- liczba dni w danym miesiącu,

t – suma średnich dobowych temperatur powietrza w badanym okresie (°C).

W celu określenia warunków skrajnie wilgotnych i skrajnie suchych, wykorzystano podział na 10 klas wartości współczynnika K:

- skrajnie suchy (ss) $k \leq 0,4$,
- bardzo suchy (bs) $0,4 < k \leq 0,7$,
- suchy (s) $0,7 < k \leq 1,0$; dość suchy (ds) $1,0 < k \leq 1,3$,
- optymalny (o) $1,3 < k \leq 1,6$,
- dość wilgotny (dw) $1,6 < k \leq 2,0$,
- wilgotny (w) $2,0 < k \leq 2,5$,
- bardzo wilgotny (bw) $2,5 < k \leq 3,0$,
- skrajnie wilgotny (sw) $k > 3,0$ [Skowera i Puła 2004]

Średnia temperatur w roku 2016 nie odbiegała znacząco od wielolecia, z kolei suma opadów, a w szczególności w lipcu była prawie dwukrotnie wyższa niż w latach 1981 - 2015. Rok 2017 charakteryzował się wysoką sumą opadów od czerwca do sierpnia. Suma opadów była dwukrotnie większa niż w wieloleciu. W roku 2018 najwyższe temperatury odnotowano w miesiącach kwiecień – sierpień. Średnia temperatura w tych miesiącach wynosiła 18 °C. W maju 2018 roku odnotowano rekordowo niskie opady deszczu (spadek o 27 %) w stosunku do wielolecia. Minimalne opady oraz wysoka temperatura w 2018 roku wpłynęła negatywnie na kondycję roślin.

1.4. Analiza statystyczna

Wyniki z trzech lat doświadczeń przeanalizowano i opracowano za pomocą pakietu R. Dla analizowanych cech sporządzono histogramy rozkładu a dodatkowo obliczono współczynnik korelacji między badanymi cechami. Odziedziczalność została obliczona przy użyciu mieszanego modelu liniowego za pomocą wzoru: $y_{ij} = \mu + \alpha_i + \tau_j + (\alpha\tau)_{ij} + \gamma_j + \varepsilon_{ij}$, gdzie y_{ij} – oznacza zmienną, μ – wielką średnią populacji, α_i – genotyp, γ_j – środowisko, $(\alpha\tau)_{ij}$ – interakcję genotypu ze środowiskiem oraz ε_{ij} – błąd losowy. Z uwagi na tylko jedno powtórzenie zawartości tłuszczu i białka oraz, że nie wszystkie genotypy charakteryzowały się pędami bocznymi, cechy te wyłączono przy obliczeniu korelacji i odziedziczalności. Obliczono dystans pomiędzy badanymi obiektami za pomocą algorytmu Manhatan. Następnie na podstawie obliczonej macierzy dystansu utworzono dendrogram ilustrujący podobieństwo między badanymi obiektami korzystając z algorytmu 'ward D.' W pracy wykorzystano również metodę analizy składowej cech głównych PCA (Principal Component Analysis) z podziałem na klastry za pomocą algorytmu kmeans. Dla poszczególnych cech obliczono wartości średnie, minimalne i maksymalne oraz współczynnik zmienności. Dla współczynnika zmienności przyjęto kryteria: 0-15% - niski współczynnik zmienności, 16-30% - średni oraz 31-50% wysoki.

2. Doświadczenie laboratoryjne

2.1. Materiał badawczy- androgeniza, krzyżowanie oddalone oraz SSD

Materiał wykorzystany do indukcji haploidów na drodze androgenyzy stanowiły mikrospory, do krzyżowania oddalonego –załączki, a do określenia możliwości otrzymania

kilku pokoleń w ciągu roku techniką (SSD)- zarodki, czterech genotypów łąbinu wąskolistnego: Lae-1, 'Karo', 'Emir', 'Graf'. W celu pozyskania materiału do zaplanowanych doświadczeń wyżej wymienionych genotypów nasiona wysiano zarówno w polu jak i w szklarni. Nasiona łąbinu wąskolistnego zostały wysiane na glebie piaszczysto – gliniastej klasy bonitacyjnej IV b. Wszystkie zabiegi uprawowe i pielęgnacyjne przed wykonaniem siewu zostały wykonane zgodnie z zaleceniami agrotechnicznymi dla łąbinu. W szklarni natomiast nasiona wysiano pojedynczo do doniczek (20x20x23) z substratem (Klasmann TS1), w sezonie jesienno – zimowym. W trakcie wegetacji stosowano środki ochrony roślin zapobiegające występowaniu chorób i szkodników, na które łąbin wąskolistny jest podatny.

2.2. Metody laboratoryjne – androgeniza, krzyżowanie oddalone oraz technika SSD

2.2.1. Metody badawcze - ocena zdolności do androgenyzy czterech genotypów łąbinu wąskolistnego za pomocą kultur izolowanych mikrospor

Zdolność czterech wybranych genotypów łąbinu wąskolistnego do androgenyzy w kulturze *in vitro* opisano w formie procedury w Tabeli nr 7.

Ocena stadium rozwojowego i żywotności mikrospor w pakach kwiatowych

Przed rozpoczęciem indukcji androgenyzy, sprawdzono stadium rozwojowe losowo wybranych pąków czterech genotypów. Z każdego pąka pobrano pylniki (górną, środkową i dolną część pąka) i sporządzono preparaty. Na szkiełko podstawowe naniesiono krople acetokarminu i wyizolowane pylniki. Materiał rozcięto, nałożono szkiełko nakrywkowe a następnie pylniki rozgnieciono w celu uwolnienia się mikrospor. Dla dokładniejszej interpretacji przygotowano preparaty z dodatkiem roztworu fluochromu DAPI i obserwowano pod mikroskopem fluorescencyjnym. Obserwacje przeprowadzono pod mikroskopem świetlnym Nikon Eklipse E 400 z kamerą Nikon Digital DXM 1200F oraz z przystawką do fluorescencji przy świetle wzbudzającym 450 – 500 nm.

Mikrospory oceniono pod kątem stadium rozwojowego. Biorąc pod uwagę udział mikrospor z jednym jądrem peryferyjnym lub centralnie umieszczonym (Zdj.8). Dodatkowo określono udział mikrospor nieżywotnych.

Indukcja androgenezy w kulturach izolowanych mikrospor

Pobrano materiał ze szklarni został podzielony na dwie części. Pierwszą część umieszczono w szalkach Petriego z niewielką ilością wody w lodówce na 7 dni w temperaturze 4 °C. Drugą wykorzystano bezpośrednio do założenia doświadczenia.

Oba materiały (chłodzony i nie chłodzony) poddano procedurze indukcji androgenezy w kulturach izolowanych mikrospor. Pąki kwiatowe odtłuszczono w detergencie przez 15 min., a następnie spryskano alkoholem 70% i przeniesiono do komory z laminarnym przepływem powietrza. Pod komorą materiał odkażono w 0,1% sublimacie przez 10 min z dodatkiem kropli Tweenu 20. Na koniec wykonano 3- krotne płukanie wodą redystylowaną (5, 10 i 15 min.).

Z odkażonych pąków, za pomocą pęsety, wyjmowano pylniki, a następnie umieszczano w moździerzu z dodatkiem 5 ml pożywki płynnej B5. Mikrospory były izolowane poprzez ostrożne rozcieranie w moździerzu. Następnie zawiesinę przefiltrowano przez filtr nylonowy o średnicy 44 μm. Zawartość wirowano trzykrotnie (1000 obr./min., temp. 23 °C przez 5 min.) Po każdym wirowaniu ostrożnie usuwano górną fazę i zastępowano ją nową pożywką. Po ostatnim wirowaniu ponownie usunięto pelet i zastąpiono ją 1 ml pożywki B5. Na koniec zawiesinę z mikrosporami umieszczono w szalkach Petriego (średnica 5,5 cm) z pięciokrotnie rozcieńczoną pożywką B5.

W doświadczeniu wykorzystano jako kontrolę płynną pożywkę B5 z dodatkiem 20 g·dm⁻¹ sacharozy oraz wzbogaconą o 0,5 mg·dm⁻¹ BA. Szalki owinięto parafilmem i przeniesiono do ciemności stosując temperaturę 24 °C. Szalki z mikrosporami obserwowano po 7, 14, 21 i 28 dniach pod mikroskopem, w celu oceny stadium rozwojowego mikrospor . Oceniono obecność stadium 1- komórkowego, 2-4 komórkowego, wielokomórkowe oraz stadium bez widocznych zmian (puste lub uszkodzone). Po każdej obserwacji szalki przenoszono do komory z laminarnym przepływem powietrza, gdzie pobierano 2,5 ml r-ru pożywki z mikrosporami do nowej szalki i uzupełniano taką samą objętością świeżego podłoża.

2.2.2. Metody badawcze- krzyżowania oddalonego *L. angustifolius x L. luteus*

Doświadczenie mające na celu indukcję haploidów za pomocą krzyżowania oddalonego zostało podzielone na dwa etapy. Podczas pierwszego etapu skupiono się na ocenie

zachowania się pyłku łubinu żółtego na znamionach *L. angustifolius*. Etap drugi dotyczył bezpośrednio optymalizacji pożywki w celu pobudzenia rozwoju zalążków.

Ocena zachowania się pyłku *L. luteus* na znamieniu *L. angustifolius*

W latach 2017 - 2018 podjęto próbę analizy przebiegu zapylenia w tym celu przeprowadzono obserwacje osadzania się pyłku na znamieniu i jego kiełkowania oraz odnotowano obecność łagiewki pyłkowej w zalążku. Nasiona wysiano w 4 rzędach po 20 roślin. W dwóch powtórzeniach w odstępie 14 dni. Przepylono cztery genotypy *L. angustifolius* z 3 genotypami *L. luteus* (500, 501, Przebędowo). Z kwiatów roślin matecznych usuwano pylniki, a po dwóch dniach наносzono pyłek form ojcowskich wg schematu zamieszonego w Tabeli nr 5. Strąki zebrano po 48, 96 i 168 godzinach od przepylenia i utrwalono w utrwalaczu Carnoya (1 objętość kwasu octowego: 2 objętości alkoholu etylowego). Po 24 godzinach słupki przepłukano i zalano 70 % alkoholem etylowym, a następnie umieszczono w lodówce do czasu obserwacji. Utrwalone słupki wykorzystano do sporządzenia preparatów wybarwiając je błękitem aniliny. Preparaty analizowano w świetle mikroskopu fluorescencyjnego w powiększeniu: 10x, 20x, 40x. Do obserwacji użyto mikroskopu Nikon Eklipse E 400 z kamerą Nikon Digital DXM 1200F oraz z przystawką do fluorescencji przy świetle wzbudzającym 450 – 500 nm. Część materiału było podstawą do sporządzenia preparatów trwałych (Filutowicz i Kuźdowicz 1951), aby sprawdzić rozwój woreczka zalążkowego. Procedurę sporządzania preparatów trwałych zamieszczono w Tabeli nr 8. Do preparatów trwałych wykorzystano zalążki odmiany Karo.

Wyniki z obserwacji zestawiono podając procentowy udział znamion z kiełkującym pyłkiem, procent obecności łagiewek pyłkowych w szyjce oraz w zalążkach w stosunku do ogólnej liczby preparatów (298 preparatów). Intensywność osadzenia się pyłku na znamieniu określono w trzystopniowej skali: 1- słabo widoczny pyłek na znamieniu, 2- kilkanaście ziaren pyłku na znamieniu, 3 – bardzo duża ilość pyłku na znamieniu.

Wpływ różnych podłoży a indukcję rozwoju zalążków uzyskanych w procesie krzyżowania oddalonego

W czasie drugiego etapu badań wyizolowano zalążki z ww. krzyżowania oddalonego na trzy warianty podłoży. Wcześniej jednak materiał przewieziono do laboratorium, gdzie poddano go dalszym czynnościom zamieszczonym w Tabeli nr 9. Słupki odłuszczone

powierzchniowo w detergencie (15 min.), a następnie spryskano alkoholem etylowym 70 % . Materiał biologiczny przeniesiono do komory z laminarnym przepływem powietrza. Aby uniknąć zakażeń w kulturach *in vitro* zebrane strąki odkażano dwuetapowo. Najpierw za pomocą 0,1 % sublimatu przez 10 min a następnie w Javelu (1:3) przez 7 min. Po każdej dezynfekcji płukano materiał w wodzie redystylowanej przez 5, 10 i 15 min. Do ostatniego płukania dodano 3 krople Citroseptu.

Po dezynfekcji słupki delikatnie rozcięto i wyizolowane załączki wykładano średnio po 20 sztuk na szalki Petriego (średnica 9 cm) w dwóch powtórzeniach dla każdego z wymienionych podłoży hodowlanych. W doświadczeniu wykorzystano jako pożywki podstawowe: B5 Gemborga (1986), NLN Nitsch i Nitsch (1969) oraz ML6 Kumar i in. (1988) (Tabela 6). Zastosowane podłoża różniły się między sobą ilością cukrów, węgla aktywnego oraz rodzajem regulatora wzrostu (Tabela 9). Szalki z załączkami przeniesiono do pokoju hodowlanego, gdzie pozostały w ciemności w temperaturze 21 °C. Przed każdą zmianą pożywki przeprowadzano obserwacje zwracając uwagę na:

- procent załączków ze zmianami (7, 14, 21 dni) – zmiana barwy oraz struktury załączka
- % załączków z kalusem po 30 dniach

Uzyskane kalusy po 30 dniach obserwacji zostały wysłane do Kutnowskiej Hodowli Buraka Cukrowego w celu oznaczenia ploidalności za pomocą cytometru przepływowego.

2.2.3. Metody badawcze - uzyskanie kilku pokoleń łubinu wąskolistnego w oparciu o metodę pojedynczych nasion (SSD)

W celu uzyskania kilku pokoleń w ciągu jednego roku wykorzystano metodę pojedynczych nasion (SSD). Pierwszy etap polegał na wysiewie nasion w warunkach szklarniowych. W szklarni zastosowano fotoperiod 16/8 h, temperaturę utrzymywano na poziomie 16/21°C oraz wilgotność 30 – 40 %.

Po 14 (stadium A) oraz 28 dniach (stadium B) od kwitnięcia zebrano strąki i przewieziono do laboratorium Katedry Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Schemat oraz terminy zamieszczono w Tabeli nr 10.

Dezynfekcja materiału

Zebrane strąki po przewiezieniu ze szklarni zostały odtłuszczone i odpowietrzone w detergencie przez 15 min, a następnie spryskany alkoholem 70%. Po przeniesieniu do komory z laminarnym przepływem powietrza. Ze strąków wyizolowano zarodki, które zostały umieszczone w r-rze Javelu (Stadium A stężenie 1:3, stadium B stężenie 1:2) na 7 min. Na koniec zastosowano trzykrotne płukanie sterylną wodą redystylowaną (5', 10', 15')

Podłoże hodowlane

W doświadczeniu wykorzystano pożywkę B5 i NLN (Tabela 6) zawierającą 3% sacharozy, 0,8% agaru oraz węgla aktywnego ($0,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-1}$). Podłoże wzbogacono następującą kombinacją regulatorów wzrostu: $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-1}$ BA + 0,1 IBA.

Stadium A (zbiór po 14 dniach od kwitnienia)

Zarodki wyłożono na szalki Petriego (o średnicy 5,5 cm) zawierającą 10 ml pożywki. Szalki przeniesiono do pokoju hodowlanego, gdzie fotoperiod ustawiony był na 16/8 h (dzień /noc) a temperatura na 16/21°C. Wykonano dwa pasaże zarodków po 14 i 28 dniach od założenia kultury do szalek z pożywką B5 z dodatkiem węgla aktywnego ($0,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-1}$). Po kolejnych 14 od ostatniego pasażu, gdy rośliny osiągnęły ok. 2 cm poddano je aklimatyzacji. Rośliny przesadzono do wielodoniczek z substratem (Klasmann TS1), zabezpieczono folią spożywczą (dla utrzymania wilgoci) a następnie przeniesiono do fitotronu na 7 dni. Fitotron ustawiono na 16/22 °C. Po upływie 7 dni materiał wysadzono do doniczek w szklarni.

Stadium B (zbiór po 28 dniach od kwitnienia)

Podobnie jak w przypadku stadium A, zarodki stadium B wyłożono na szlaki Petriego (o średnicy 5,5 cm) zawierającą 10 ml. Ze względu na szybki wzrost, materiał przepasażowano do słoików zawierających pożywkę B5 z dodatkiem węgla aktywnego ($0,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-1}$). Po kolejnych 14 dniach materiał poddano aklimatyzacji. Rośliny przesadzono do wielodoniczek z substratem, zabezpieczono folią spożywczą (dla utrzymania wilgoci), a następnie przeniesiono do fitotronu na 7 dni. Fitotron ustawiono na 16/22 °C. Po upływie 7 dni rośliny wysadzono w polu, podlano i osłonięto agrowłókniną tworząc tunel.

Zbiór strąków z pola ponowiono po 28 dniach od zakwitnięcia łubinu. Zrezygnowano ze zbioru strąków po 14 dniach z powodu złej kondycji zarodków we wcześniejszym etapie w kulturach *in vitro*. Całą procedurę pobierania strąków i hodowlę w kulturach *in vitro* powtórzono do uzyskania kolejnego pokolenia.

2.3. Warunki klimatyczne

Dane meteorologiczne dotyczyły trzech okresów wegetacyjnych: 2016, 2017 oraz 218 i zostały udostępnione przez Rolniczy Zakład Doświadczalny Swojec Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (Wykres 2a, 2b, 2c). W 2016 roku średnia temperatura nie odbiegała znacząco od wielolecia, poza wrześniem, gdzie wynosiła 16,4 °C i była wyższa o 2,7 stopnia (Tabela 4b). Znaczne opady odnotowano w 2016 roku. W lipcu były 36,8 mm wyższe w stosunku do lat 1981- 2015. Rok 2017 charakteryzował się najniższą temperaturą w stosunku do wielolecia, w szczególności w takich miesiącach jak: maj, kwiecień oraz wrzesień. Z kolei suma opadów w lipcu była znacząco wyższa (o 32,4 mm). Rok 2018 charakteryzował się najwyższą temperaturą oraz niską sumą opadów. Różnicę widać szczególnie w sierpniu (20,3 mm), gdzie suma opadów była trzy razy niższa niż w wieloleciu (65,3 mm).

2.4. Analiza statystyczna

Dane uzyskane z obserwacji rozwoju zalążków pochodzących ze skrzyżowania krzyżowaniu czterech genotypów *L. angustifolius* z induktorem *L. lutesu* poddano trójczynnikiem analizie wariancji w programie Statistica. Czynnikiem był genotyp (Emr, Karo, Graf, Lae-1), rodzaj induktora (*L. luteus* 500, 501 oraz *Przebedowo*) oraz trzy różne podłoża hodowlane (B5,NLN, M6). Otrzymane wyniki można było zinterpretować pod kątem wpływu podłoża i przepylaczy na rozwój zalążków.

Do analizy wyników uzyskanych z obserwacji rozwoju mikrosor na drodze androgenezы wykorzystano trójczynnikiem analizę wariancji. Czynnikiem był genotyp ('Emr', 'Karo', 'Graf'), podłoża hodowlane (B5 i B5+ 0,5 mg·dm⁻¹ BA) oraz termin obserwacji (7, 14, 21 i 28 dni). W przypadku wykazania istotnych różnic, wartości średnie zostały pogrupowane za pomocą testu Tukeya.

VI. Omówienie wyników

1. Ocena zmienności fenotypowej linii RILs łubinu wąskolistnego pod względem cech użytkowych

Wyniki uzyskane w latach 2016- 2018 dla 108 linii RILs przeanalizowano pod względem zakresu zmienności analizowanych cech, wykorzystując podstawowe parametry statystyczne. Analiza wartości średnich z trzech lat badań umożliwiła obliczenie współczynnika korelacji, odziedziczalności, a także współczynnik zmienności. Dla cech morfologicznych i struktury plonu wykonano histogramy obrazujące frekwencje występowania osobników w poszczególnych zakresach analizowanych cech.

W Tabeli 11 zestawiono współczynniki korelacji dla wybranych cech morfologicznych i struktury plonów łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.). Analizując wyniki wykazano istotną korelację pomiędzy takimi cechami jak: wysokość pędu głównego a wysokość całej rośliny ($r= 0,88$), długość kwiatostanu na pędzie głównym a liczba okółków na pędzie głównym ($r= 0,74$) oraz długość kwiatostanu na pędzie głównym a liczba zawiązanych strąków na pędzie głównym ($0,74$). Nie stwierdzono istotnych korelacji pomiędzy pozostałymi cechami.

W Tabeli 12 zamieszczono odziedziczalność analizowanych cech. Największy wpływ środowiska zauważono dla takich cech jak: wysokość całej rośliny, długość kwiatostanu pędu boczego, liczba rozgałęzień produktywnych I rzędu, liczba okółków na pędzie głównym, liczba zawiązanych strąków na pędzie głównym. Środowisko miało również istotny wpływ na plonowanie oraz masę tysiąca nasion.

Dla wysokości pędu głównego stwierdzono rozkład normalny. Wartość tej cechy mieściła się w przedziale 44-74,7 cm (Wykres 3), a współczynnik zmienności był bardzo niski bo 4,5% (Tabela 13). Najliczniejsza grupa linii (77%) miała wysokość pędu do 63 cm. Tylko dwie linie charakteryzowały się wysokością powyżej 70 cm.

Biorąc pod uwagę wysokość całej rośliny (Wykres 4), wartości średnie dla analizowanych linii mieściły się w przedziale 46,2-75,1 cm. Tu również stwierdzono niski współczynnik zmienności (4,8%) podobnie jak dla wysokości pędu głównego. Obie te cechy są stabilne na tle pozostałych i pozostają pod mniejszym wpływem środowiska.

U analizowanych linii łubinu wąskolistnego liczba rozgałęzień produktywnych pierwszego rzędu mieściła się w przedziale od 1 do 5 sztuk (Wykres 5). Najliczniejsza grupa linii (41%) charakteryzowała się dwoma rozgałęzieniami, a tylko pięć, spośród wszystkich,

linii posiadało więcej niż 3 rozgałęzienia produktywne. Współczynnik zmienności w tej grupie wyniósł 37%.

U badanej populacji długość kwiatostanu pędu głównego mieściła się w przedziale od 10 do nawet 40 cm (Tabela 13, Wykres 6). Najliczniej reprezentowana była grupa linii o roślinach z kwiatostanem długości 16- 21 cm (38%). W obserwowanej populacji tylko jedna linia miała kwiatostany o długości 10 cm a tylko dwie powyżej 35 cm. Współczynnik zmienności dla tej cechy równał się 15,3 %

Średnia liczba okółków na pędzie głównym wynosiła 9,9 sztuk. (Wykres 7). Najliczniejszą grupę (50 %) stanowiły linie powyżej 10 okółków. Z kolei linie z liczbą okółków do 8 sztuk stanowiły 21%. Spośród wszystkich linii tylko dwie miały liczbę okółków powyżej 14. Współczynnik zmienności wyniósł ponad 50 % (Tabela 13) co daje największy procent zmienności spośród wszystkich analizowanych cech.

Uwzględniając liczbę strąków na pędzie głównym stwierdzono niestandardowy rozkład cech. Liczba strąków wynosiła 1-10 sztuk (Wykres 8). Dla 20% linii średnia liczba strąków nie przekraczała 5 sztuk. Tylko jeden z rozpatrywanych genotypów miał 10 strąków. Współczynnik zmienności dla badanej cechy znajdował się na poziomie 48,1%.

Długość kwiatostanu pędu bocznego badanej populacji mieściła się w przedziale 3,5 – 10,3 cm (Wykres 9), a średnia ich długość wynosiła 6,4 cm (Tabela 13). Spośród wszystkich linii, 70 % z nich miało naj długość do 7 cm. Tylko jedna linia odznaczała się długością kwiatostanu pędu bocznego powyżej 10 cm.

U wszystkich linii liczba okółków na pędzie bocznym (Wykres 10) była mniejsza niż na pędzie głównym. Ich liczba wynosiła od 1 do 5 sztuk (Tabela 13). Najliczniejsza grupa linii miała średnio 2 okółka (22%). Tylko jeden genotyp miał 5 okółków na pędzie bocznym. Również liczba zawiązanych strąków na pędzie bocznym, u badanych roślin, była mniejsza niż na pędzie głównym (Wykres 11). Największą grupę stanowiły obiekty posiadające po 3 zawiązane strąki na pędzie bocznym (25%). Z przebadanych obiektów tylko 3 linie miały średnio po 4 strąki. Współczynnik zmienności dla badanej cechy znajdował się na poziomie 49,3%.

Oceniając plon z trzech lat prowadzonych badań stwierdzono, że linie łubinu wąskolistnego plonowały średnio od 0,2 do 1,1 kg z poletka (Wykres 12). Średni plon dla wszystkich obiektów wyniósł 0,6 kg z poletka, natomiast plon powyżej 1kg odnotowano tylko u jednej linii. Obliczony współczynnik zmienności wyniósł 22% (Tabela 14a). W przypadku średniej masy 1000 nasion u badanych genotypów *L. angustifolius* L. wyniosła ona 142,4 g (Wykres 13). Ponad 27 % rozpatrywanych genotypów charakteryzowało się średnią masą

tysiąca nasion (MTN) powyżej 150 g. Tylko 9 % z rozpatrywanych linii uzyskał średnią powyżej 160 g (Tabela 14a). Współczynnici dla tej cechy wyniósł 4,7%.

Spośród 108 linii łubinu wąskolistnego 6% genotypów miała zawartość białka poniżej 30 %, a tylko dwie linie miały go powyżej 35 % (Wykres 14. Tabela 14b). Współczynnik zmienności oznaczony dla badanej cechy wyniósł 4,8%.

Analizując zawartość tłuszczu w nasionach u badanych genotypów (Wykres 15, Tabela 14b) stwierdzono, że największą grupę stanowiło 42% linii o zawartości na poziomie 7,25 %- 7,75 %. Tylko jeden z genotypów miał zawartość tłuszczu powyżej 10%. Obliczona zmienność dla badanej cechy sięgała 5,3%.

W celu pogrupowania wszystkich badanych linii łubinu wąskolistnego wykorzystano analizę skupień (Wykres 16). Zastosowane pogrupowanie umożliwiło wyodrębnienie linii podobnych do siebie pod względem wszystkich analizowanych cech. Dzięki temu można było stwierdzić jak liczne są te grupy i które genotypy posiadają zbliżone do siebie wartości analizowanych cech. Za pomocą wymienionej analizy wyodrębniono 4 klastry. W pierwszej grupie znalazło się ponad 32% obiektów (Tabela 15a), które charakteryzowały się najwyższą średnią u wszystkich cech morfologicznych. W klastrze drugim znalazło się 33 % badanych obiektów (Tabela 15b), które wyróżniały się takimi cechami jak najwyższa średnia wysokość całej rośliny (63,7 cm), plon (0,7 kg) i masa tysiąca nasion (147,2 g). Klaster trzeci (16%)(Tabela 15c) oraz czwarty (19%) (Tabela 15d) składały się z najmniejszej liczby obiektów i obie grupy charakteryzowały się niższymi średnimi u wszystkich badanych siedmiu cech.

Wykorzystana w pracy analiza składowych głównych pozwoliła na wyodrębnienie istotnych dwóch pierwszych składowych, które wyjaśniają 74,7% zmienności. Pierwsza składowa główna odpowiadała za 45,06 % zmienności, natomiast druga za 29,61% (Tabela 16). Największy udział w tworzeniu pierwszej składowej miały wysokość pędu głównego (0,50) oraz całej rośliny (0,47). W skład drugiej wchodziły cechy: wysokość całej rośliny (-0,43) oraz masa tysiąca nasion (-0,59) (Tabela 17). W PCA wyodrębniono również trzy klastry (Wykres 17), w których stwierdzono 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.

Pierwsza grupa (Tabela 18a), która składała się z najmniejszej liczby obiektów (28%) wśród badanych linii RILs, wyróżniała się najwyższą średnią wysokością całej rośliny (65,6 cm), W klastrze drugim (Tabela 18b) znalazło się ponad 38% badanych obiektów. Grupa ta

charakteryzowała się najniższą średnią pod względem wszystkich średnich wartości badanych cech, w stosunku do pozostałych klastrow oprócz liczby zawiązanych strąków na pędzie głównym. Aż 60 % w tej grupie stanowiły rośliny o pokroju tradycyjnym. Grupa trzecia (Tabela 18c) charakteryzowała się najwyższą średnią długością pędu głównego (62,0 cm), długością kwiatostanu pędu głównego (29,0 cm), oraz największą liczbą okółków (11,6) i zawiązanych strąków (7,4) na pędzie głównym. Ponad 97% roślin stanowiły formy epigonalną. Średnia wartość dla plonu oraz masy tysiąca nasion, porównując wszystkie badane klastry, była na podobnym poziomie.

2. **Możliwość skrócenia procesu homozygotyzacji u *L. angustifolius* L. na drodze indukcji haploidów oraz zastosowania techniki SSD**

2.1. Wykorzystanie krzyżowania oddalonego *L. angustifolius* x *L. luteus* do indukcji haploidów

2.1.1. Ocena zachowania pyłku w czasie prowadzenia krzyżowania oddalonego łubinu wąskolistnego

Do oceny przydatności krzyżowania oddalonego przetestowano zachowanie pyłku (Zdjęcie 1) trzech genotypów *L. luteus* (500, 501 oraz Przebędowo). Oceniono procentowy udział znamion z osadzonym pyłkiem po 48 oraz 96 godzinach od momentu przepylenia znamion *L. angustifolius* (Tabela 19). Największy udział znamion z osadzonym pyłkiem stwierdzono dla odmiany Karo (97,9%), następnie 'Emir' (76,2%), Lae-1 (79%), a najmniejszy dla odmiany Graf (72,6%). Analizując wpływ źródła pyłku, pod względem wykorzystanych trzech zapylaczy, najlepsze efekty odnotowano u 'Emir' stosując przepylacz 500 i 501. W przypadku 'Graf' najlepszy okazał się pyłek *L. luteus* Przebędowo. Dla 'Karo' najlepszym donorem okazał się *L. luteus* 501 oraz Przebędowo, a z kolei dla linii Lae-1- 500. Pod względem intensywności osadzania się pyłku na znamieniu wyraźnie wyróżnia się odmiana Karo (1,5). Pozostałe obiekty charakteryzowały się o 20 % gorszym osadzeniem się pyłku. Warto jednak zwrócić uwagę na widoczny wpływ donora pyłku Przebędowo na odmianę Graf, gdzie intensywność osadzenia wynosiła 1,7.

W następnej części analizy łagiewki pyłkowej zwrócono uwagę na ocenę udziału znamion z kielkującym pyłkiem, wrastaniem w szyjkę słupka i do załączka. Na podstawie danych zawartych na Wykresie 18 stwierdzono, że najlepszymi układami krzyżowania, biorąc pod uwagę wszystkie układy krzyżowań, okazał się Lae-1 x Przebędowo. Najslabiej w zestawieniu wypada 'Karo' x Przebędowo. Największy udział znamion z kielkującym pyłkiem odnotowano w układzie krzyżowania 'Graf' x Przebędowo oraz 'Graf' x 500 (57%). Z kolei najlepsze wrastanie łagiewki przez słupek i w załączek można było zaobserwować u 'Emir' x 501, 'Emir' x Przebędowo oraz Lae-1 x Przebędowo. U odmiany Emir x Przebędowo wrastanie łagiewki przez słupek, załączek oraz procent znamion z kielkującym pyłkiem utrzymywał się średnio na poziomie 60%, u 'Emir' x 501 na poziomie 58 i 70%, a u Lae-1 x Przebędowow 80 i 65%. W przypadku układu krzyżowania 'Karo' x 500 i 501 wrastanie łagiewki przez słupek oscylowało na poziomie 43 %. Biorąc pod uwagę procent kielkowania pyłku na znamieniu najlepsza była kombinacja krzyżowania 'Karo' x 500

(73,3%). Dla henotypu Lae-1 najkorzystniejszą formą zapylającą był *L. luteus* Przebędowo, gdzie odnotowano najwyższe średnie procentowe wartości dla takich parametrów jak: procent znamion z kiełkującym pyłkiem (80%), procent wrastających łagiewek przez słupek (80%) oraz procent obserwowanego wzrostu łagiewki w zalążkach (66,67%).

2.1.2. Ocena histologiczna rozwoju woreczka zalążkowego u odmiany Karo pod wpływem trzech donorów pyłku *L. luteus*

Na podstawie analizy pyłku na znamieniu czterech odmian łubinu wąskolistnego, do preparatów trwałych, wytypowano odmianę Karo (Tabela 20). Z przeprowadzonych obserwacji wynika, że po 48 godzinach od przepylecia *L. angustifolius* z *L. luteus* 500 i 501 (Zdjęcie 2A) nie stwierdzono żadnych zmian w woreczkach zalążkowych, w odróżnieniu do 'Karo' x *L. luteus* Przebędowo, gdzie stwierdzono podziały komórkowe (Zdjęcie 4A). W układzie krzyżowania 'Karo' z *L. luteus* Przebędowo po 96 godzinach zauważono w woreczku struktury wielokomórkowe (Zdjęcie 4B). Natomiast po 168 godzinach zarówno w układzie 'Karo' x *L. luteus* 501 jak i 'Karo' z *L. luteus* Przebędowo można było zaobserwować wykształcający się zarodek (Zdjęcie 3B, 3C, 4C). Z kolei w przy krzyżowaniu 'Karo' x *L. luteus* 500 w podobnym czasie woreczek zaczął ulegać degradacji (Zdjęcie 2C). Zjawisko to również zaobserwowano u 'Karo' x *L. luteus* 501 po 96 godzinach (Zdjęcie. 3A).

2.1.3. Ocena rozwoju zalążków łubinu wąskolistnego w kulturach *in vitro*

W przeprowadzonych badaniach analizowano wpływy różnych podłoży hodowlanych, genotypów form matecznych *L. angustifolius* oraz genotypów zapylających *L. luteus*: 500,501 oraz Przebędowo na indukcję rozwoju zalążków w kulturach *in vitro* po 7, 14, 21 i 30 dniach, ze szczególnym uwzględnieniem rozwoju kalusów po 30 dniach. Dla większości analizowanych cech stwierdzono istotny wpływ poszczególnych źródeł zmienności (Tabela 21).

Istotny wpływ pożywki stwierdzono dla procentu zalążków ze zmianami po 7 dniach obserwacji. W pozostałych terminach podłoże hodowlane nie wpłynęło znacząco na badaną cechę. Interakcja genotypu formy matecznej z induktorem zapylającym w późniejszych terminach obserwacji tj. po 21 i 30 dniach nie była istotna co wskazuje na podobną reakcję na stosowane czynniki (Tabela 21).

Porównując genotypy formy matecznej (Tabela 22) stwierdzono, że zalążki odmiany Graf uzyskały najlepszy efekt rozwoju po tygodniu od założenia kultury w porównaniu do 'Karo'. Nie odnotowano natomiast istotnej różnicy pomiędzy wymienionymi genotypami po ponad 14 dniach w układzie zalążków ze zmianami. Widoczne zróżnicowanie w rozwoju można zaobserwować w późniejszych terminach tj. po 21 dniach u 'Karo' (78,97%) i po ponad 30 dniach u 'Emir' (89,16%). Z kolei największy procent kalusów po 30 dniach (ponad 80%) stwierdzono u odmiany Karo i linii Lae-1 (Tabela 22 i Zdjęcie 6).

Jednym z głównych celów pracy było wytypowanie donora pyłku, który byłby uniwersalny podczas prowadzenia krzyżowania. Najkorzystniejszy wynik związany z indukcją zalążków w pierwszych trzech terminach obserwacji odnotowano dla łubinu żółtego 500 (Tabela 23). W efekcie finalnym tj. po 30 dniach prowadzenia kultury zalążków, genotyp 500 był lepszy w porównaniu do formy Przebédowo, a nie różniły się znacząco od 501. Najmniej korzystnym donorem pyłku dla rozwijających się zalążków okazał się *L. luteus* Przebédowo biorąc pod uwagę wszystkie terminy obserwacji oraz procent kalusów.

Wskazanie najkorzystniejszego podłoża hodowlanego ma duże znaczenie w przypadku opracowania skutecznej metody indukcji zalążków uzyskanych w wyniku krzyżowania łubinu wąskolistnego z łubinem żółtym. Istotny wpływ pożywek na procentowy udział zalążków ze zmianami został stwierdzony w pierwszym terminie obserwacji (po 7 dniach), gdzie najlepszy efekt uzyskano na podłożu P1_B5+AC (Tabela 24). Jednak widoczne zmiany nie utrzymały się w kolejnych terminach badań. Wszystkie podłoża miały podobny wpływ na rozwój eksplantatów.

Biorąc pod uwagę interakcję genotypu formy matecznej z induktorem zapylającym widać istotny wpływ na rozwój zalążków w pierwszych dwóch tygodniach prowadzenia kultury (Tabela 25). W pozostałych terminach nie stwierdzono istotnej różnicy między badanymi obiektami. Najwyższy procent zalążków ze zmianami po 14 dniach w porównaniu do wszystkich genotypów uzyskał 'Karo' x *L. luteus* 500 (63,73%). Również dla 'Emir' i Lae-1 pyłek *L. luteus* 500 okazał się najkorzystniejszym induktorem po 14 dniach (Zdjęcie 5). Najmniej korzystnie na zmiany w rozwoju zalążków w ciągu dwóch tygodni dla 'Karo' i 'Emir' wpływał donor pyłku Przebédowo. Zupełnie inaczej prezentuje się sytuacja u odmiany Graf. Wspomniana forma zapylająca, w porównaniu do innych zapylaczy, wpłynęła znacząco na badane zalążki już po 7 dniach od prowadzenia kultury. Ta tendencja niestety nie utrzymuje się w późniejszym czasie.

Na podstawie wyników zebranych w Tabeli 26 przeanalizowano interakcję genotypu formy matecznej z trzema podłożami hodowlanymi. Żadna z badanych pożywek nie wpłynęła

na rozwój zalążków u odmiany Emir w 7 i 14 dniu obserwacji. Widoczne zmiany można było dostrzec dopiero w późniejszych terminach, gdzie wyłożone na pożywce P1_B5+AC zalążki reagowały gorzej od P3_ML6 o 35% po 21 dniach i o 37 % po 30 dniach. U ‘Graf’ wpływ podłoża na badane zalążki widać już po 7 dniach od założenia doświadczenia. Na pożywka P1_B5+AC uzyskano o 50 % więcej materiału z widocznymi zmianami niż na P2_NLN i P3_ML6. Zalążki ‘Graf’ uległy w największym stopniu zmianom biorąc pod uwagę rozwój kalusa na dwóch zastosowanych pożywkach tj. P1_B5+AC oraz P2_NLN. Zarówno u ‘Karo’ jak i linii Lae-1 wszystkie użyte w badaniach podłoża hodowlane nie oddziaływały znacząco na zalążki w pierwszych dwóch tygodniach prowadzonych doświadczeń. Pierwsze istotne zmiany u badanych eksplantatów widać po 21 dniach prowadzenia kultury. Dla odmiany Karo najmniej korzystny efekt dało podłoże P2_NLN, z kolei u linii Lae-1 była to pożywka P1_B5+AC.

Wyniki zawarte w Tabeli 27 przedstawiają interakcję induktora przepylającego z zastosowanymi podłożami hodowlanymi. W przypadku udziału donora pyłku *L. luteus* 500 i 501 nie stwierdzono istotnych różnic w rozwoju zalążków po 7 dniach inkubacji na zastosowanych pożywkach.

Analizując rozwój zalążków, gdzie donorem pyłku było *L. luteus* Przebędowo można zaobserwować ich rozwój na pożywce P1_B5 + AC już po 7 dniach (27,47%), a wyraźne zahamowanie wzrostu badanych obiektów zauważono po 14 dniach. Zalążki wyłożone po 7 dniach na B5+AC oraz P2_NLN rozwijały się znacznie gorzej w stosunku do tych obiektów, które były na pożywce P3_ML6 (Tabela 27).

Ważnym elementem w opracowywaniu danych była analiza regenerujących zalążków w zależności od układu krzyżowania formy matecznej z induktorem zapyłacza i rodzaju pożywki (Tabela 28). Procent zalążków z widocznymi zmianami był zróżnicowany- od braku reakcji przez cały cykl prowadzenia badań do 100% zmian po trzech- czterech tygodniach.

Dla odmiany Emir największy procent zalążków ze zmianami po 21 i 30 dniach (100%) odnotowano w przypadku wykorzystania jako zapyłacza *L. luteus* Przebędowo na pożywce P2_NLN oraz P3_ML6. Również zalążki będące wynikiem tego układu krzyżowania uległy w największym stopniu zmianom uwzględniając rozwój kalusa w obu wariantach podłoża. Brak jakiegokolwiek reakcji odnotowano z kolei u ‘Emir’ x Przebędowo na P1_B5+ AC. Pozostałe układy krzyżowań na wszystkich wariantach pożywki były na statystycznie porównywalnym poziomie. Dla ‘Graf’ genotyp Przebędowo również okazał się najkorzystniejszym zapyłaczem. Na podłożu P1_B5+AC zaobserwowano istotny rozwój eksplantatów już po 7 dniach od założenia kultury (75%), natomiast po 30 dniach widoczne

były struktury na powierzchni wszystkich badanych zalążków. Tkanka kalusowa odmiany Graf najlepiej rozwijała się na pożywce P2_NLN (93,8%) oraz na P3_ML6 (91,4%). Pozostałe kalusy kształtowały się na podobnym poziomie – średnio 68 %. W prowadzonych badaniach najlepiej zareagowała 'Karo' po użyciu donoru pyłku *L. luteus* 500 i 501. Widać, że zastosowanie genotypów 500 i 501 w większości analizowanych przepyleń daje efekty już po 14 dniach, co potwierdza interakcja genotyp formy matecznej x genotyp zapylacza (Tabela 25). Dla 'Karo' tkanka kalusowa była stosunkowo obfita we wszystkich wariantach podłoży hodowlanych- średnio 82%. Zalążki linii Lae-1 reagowały podobnie na wszystkich pożywkach po 7 dniach od założenia kultury. Widoczny wzrost odnotowano po 14 dniach u Lae-1 x *L. luteus* 500 na P1 (o 46%) oraz z *L. luteus* Przebędowo na P3_ML6 (o 56%). Tendencja wzrostowa utrzymywała się przez kolejne dwa tygodnie. Najslabiej reagowały eksplantaty Lae-1 x *L. luteus* Przebędowo na pożywce P2_NLN, gdzie początkowo przyrost strukturalny na powierzchni zalążka wynosił średnio 20%. W przypadku indukcji tkanki kalusowej najwięcej zalążków (powyżej 95%) odnotowano dla czterech układów krzyżowań: Lae-1 x 500 na pożywce P1 oraz P3_ML6, Lae-1 x 501 na P2_NLN i Lae-1 x *L. luteus* Przebędowo na P3_ML6.

Otrzymane kalusy po analizie za pomocą cytometru przepływowego charakteryzowały się poziom płodności w przypadku układu krzyżowania Lae-1 z *L. luteus* 500 na poziomie 1x 2x (Zdjęcie 14)

2.2. Ocena zdolności do androgenezy czterech genotypów łubinu wąskolistnego za pomocą kultur izolowanych mikrospor

Ocena żywotności oraz stadium rozwojowego mikrospor

Przed założeniem doświadczeń ocenione zostało położenie pąków kwiatowych na kwiatostanie, które zawierały najkorzystniejsze jednojądrowe lub dwujądrowe mikrospory czterech genotypów łubinu wąskolistnego ('Emir', 'Graf', 'Karo' i Lae-1). Zebrane kwiaty (Zdjęcie 7) podzielone zostały na trzy części: górną, środkową i dolną. Pylniki pobrane z górnej części kwiatostanu miały kolor jasno zielony i były najmniejsze, w stosunku do tych wyizolowanych ze środkowej i dolnej części. Pylniki pochodzące z dolnych segmentów miały kolor jasnożółty. Przeprowadzone badania cytologiczne pokazały, że stadium rozwojowe ziaren pyłku znacząco różni się w zależności od lokalizacji pylników pobieranych z trzech części kwiatostanu. Ziarna pyłku wyizolowane z górnego segmentu charakteryzowały się

beźądrowymi mikrosporami. U mikrospor pochodzących ze ąródkowej (Zdjęcie 8) części kwiatostanu można było zaobserwować stadium jednojądrowe lub dwujądrowe oraz sporadyczne tetrady. Z kolei u mikrospor z dolnego segmentu stwierdzono zaawansowane stadium rozwojowe w postaci dojrzałych ziaren pyłku. W oparciu o wyniki z obserwacji do kultur *in vitro* wyizolowano pylniki ze ąródkowej części kwiatostanu czterech badanych genotypów.

Obserwacje mikrospor po założeniu kultury *in vitro*

Analizując wszystkie zebrane dane stwierdzono istotny wpływ trzech genotypów *L. angustifolius*, pożywki oraz terminu na rozwój mikrospor (Tabela 29) wykorzystanych do androgenezy.

Porównując wyniki trzech genotypów - 'Emir', 'Karo' oraz 'Gra' (Tabela 30) widać, że najmniejszy procent stanowiły struktury 2-4 komórkowe u odmiany Karo (18,6%), zaś u 'Emira' i 'Graf' liczba tych struktur utrzymywała się na podobnym poziomie (26%). Inaczej wygląda sytuacja z liczbą struktur wielokomórkowych. Największy ich procent odnotowano u 'Graf' (32,9%) i 'Karo' (34,8%).

Wskazanie najkorzystniejszego podłoża hodowlanego ma duże znaczenie w przypadku opracowania skutecznej metody indukcji mikrospor na drodze androgenezy. Pożywka B5 okazała się mniej korzystnym podłożem w stosunku do B5+ 0,5 mg·dm⁻¹ BA, z uwagi na większą liczbę komórek pustych (29%) (Tabela 31). Na tym wariacie pożywki zaobserwowano również znaczną liczbę komórek uszkodzonych.

Istotną różnicę w rozwoju mikrospor widać po 7 dniach od założenia kultury (Tabela 32) u form jednokomórkowych, gdzie odnotowano największy ich procent – 26,7 % w stosunku do pozostałych struktur. Najmniej w podanym terminie było struktur wielokomórkowych (19%).

U Lae-1 po 7 dniach obserwacji struktury jednokomórkowe na pożywce B5 stanowiły ok. 15%, struktury 2- 4 komórkowe- ok. 35% a wielokomórkowe ponad 41% (Wykres 19). Po 14 dniach liczba struktur 2-4 komórkowych wzrosła do 39%, a wielokomórkowych do 48%. W trzecim tygodniu nastąpiło zahamowanie rozwoju mikrospor i przyrost struktur uszkodzonych, dlatego zaprzestano dalszych obserwacji. Z uwagi na zakażenia mikrospor na pożywce B5+ 0,5 mg·dm⁻¹ BA, po kilku dniach hodowli również nie podjęto dalszych obserwacji.

2.3 Uzyskanie kilku pokoleń łubinu wąskolistnego w oparciu o metodę pojedynczych nasion (SSD).

Badania przeprowadzone w celu otrzymywania kilku pokoleń w ciągu jednego roku wykazały, że rozwój zarodków zygotycznych pobranych po 14 dniach (stadium A) od kwitnienia (Zdjęcie 9) przebiegał dużo gorzej niż u tych, które zebrano po 28 dniach (stadium B) (Zdjęcie 10). W czasie prowadzenia kultury *in vitro* u zarodków w stadium A zaobserwowano słaby wzrost korzeni na wszystkich wariantach podłoża (Wykres 20). Ich średnia długość po 14 dniach wynosiła od 0,3 do 0,5 cm. Część pędowa rozwijała się równolegle z korzeniami. U genotypów 'Emir' i Lae-1 już po 7 dniach zaobserwowano zmiany koloru osi zarodkowych- z zielonego na kolor biały i żółty, wkrótce cały materiał uległ obumarciu. Podobne zjawisko zaobserwowano u odmiany Graf na pożywce NLN + AC + 0,2 BA + 0,1 IBA. Dodatkowo w trakcie prowadzenia kultury odnotowano systemiczne zakażenia rozwijających się eksplantatów. Po 28 dniach w kulturach *in vitro* odmiany Karo i Emir pozostało tylko 2 % wykształconych roślin (Wykres 21). Rośliny te podczas aklimatyzacji były wiotkie i miały słaby system korzeniowy. Średnia długość korzeni wynosiła 1,9 – 2,25 cm, natomiast pędy miały średnią wysokość 5,5 cm. Po 7 dniach przesadzono materiał do doniczek (Zdjęcie 11a). Mimo zapewnienia optymalnych warunków do wzrostu, rośliny zaczęły więdnąć i w ostateczności obumarły.

Zarodki pobrane po 28 dniach charakteryzowały się szybkim wzrostem, dlatego już po 7 dniach przepasażowano je z szalek do słoików z taką samą kombinacją regulatorów jak w przypadku stadium A. Zarodki ze stadium B cechowały się lepszym wzrostem korzeni oraz wykształciły silniejsze pędy, niż te ze stadium A, z których materiał został pobrany dwa tygodnie wcześniej. Średnia długość pędów po 14 dniach od założenia kultury wynosiła 1,9 – 2,3 cm, natomiast średnia wysokość pędów - 2,9- 3,20 cm (Wykres 22) . Po 14 dniach wystąpiło ok. 40 % zakażeń, w szczególności u 'Graf' i Lae-1. Po 28 dniach wszystkie wykształcone rośliny przeniesiono do aklimatyzacji. Materiał charakteryzował się długimi korzeniami i długimi pędami. Średnia długość korzeni wynosiła 4,5 – 6,6 cm, natomiast średnia wysokość pędów równała się 6 cm (Wykres 23).

Podczas wzrostu roślin w polu, u linii Lae-1 zaobserwowano słaby przyrost, a w rezultacie brak kwitnienia i strąków. W najlepszej kondycji były odmiany Karo, Graf oraz Emir (Zdjęcie 11b, 11c, 12). Z roślin wyprowadzonych ze stadium A w warunkach polowych nie zebrano strąków. Osie zarodków (stadium B) w pokoleniu drugim charakteryzowały się w kulturach

in vitro słabszym wzrostem w porównaniu do pokolenia pierwszego. Wysokość pędów i długość korzeni u większości roślin pokolenia drugiego były o prawie 50% mniejsza niż w przypadku pokolenia poprzedniego. W wyniku problemów z aseptycznością kultury u wszystkich genotypów wystąpiło ok. 30 % zakażeń na każdym wariantcie podłoża, dlatego też nie udało się uzyskać zdrowych roślin Lae-1 i 'Graf'. Podjęto się próby aklimatyzacji odmiany Karo i Graf. Materiał ponownie posadzono do doniczek i zebrano strąki po 28 dniach od kwitnienia. Zarówno u 'Karo' jak i 'Emir' (F3) można było zaobserwować po 14 dniach korzenie. Ich średnia długość wynosiła ok. 2,5 cm a wysokość pędów szacowano na ok. 3,5 -4 cm. Podczas prowadzenia kultury nie stwierdzono zakażeń.

VII. Dyskusja

1. Ocena zmienności fenotypowej linii RILs łubinu wąskolistnego pod względem cech morfologicznych i struktury plonu

Badania polowe prowadzone przez trzy sezony wegetacyjne miały na celu określenie zmienności wybranych cech morfologicznych, struktury plonu oraz dwóch parametrów jakościowych nasion łubinu wąskolistnego. Przedstawione wyniki, w niniejszej pracy dowodzą, że kolekcja jest zróżnicowana po względem takich cech jak liczba strąków na pędzie głównym (50,5%), liczba zawiązanych strąków na pędzie głównym (48,1%) oraz liczba zawiązanych strąków na pędzie bocznym (49,1%). Otrzymana w doświadczeniu zmienność jest wyższa niż w przeprowadzonych badaniach nad roślinami z rodzaju *Lupinus* [Georgieva i in. 2018, Gonzalez-Andres i in. 2006, Galek 2010, Galek i Sawicka 2001]. Wysokie wartości współczynnika zmienności w niniejszej pracy, dają możliwość selekcji form o pożądanym właściwościach.

Stosunkowo niewielką zmienność zaobserwowano pod względem wysokości pędu głównego (4,5%) oraz wysokości całej rośliny (4,8%) (Tabela 13). Podane wartości różnią się od prac innych autorów [Galek 2010, Georgieva i in. 2018, Chen i in. 2011]. W pracy Galek (2010) zmienność cechy wysokość całej rośliny u *L. angustifolius* L. 'Graf' wynosiła 8 %, u 'Emir' 12%. Natomiast wysokość pędu głównego u 'Graf' było to 11%, a u 'Emir' 32%. Wyższy współczynnik zmienności u w.w cech odnotowano również u dzikich genotypów *L. angustifolius* w pracy Chen (2011) – 24%. Otrzymane w pracy wyniki sugerują, że warunki środowiskowe nie mają wpływu na otrzymane wartości i cechy w analizowanej populacji są stabilne. Pomimo niskiego współczynnika zmienności dla badanych cech, należy zwrócić jednak uwagę na różnice biorąc pod uwagę wartości minimalne - 44,0 cm i maksymalne- 74,7 cm u wysokości pędu głównego oraz 46,2 cm i 75,1cm u wysokość całej rośliny.

Rozpatrując trzyletnie wyniki badań, warto zauważyć, że wszystkie istotne korelacje pomiędzy badanymi cechami były dodatnie. Silnie dodatnią korelację otrzymano w niniejszej pracy między wysokością całej rośliny a wysokością pędu ($r= 0,88$). W pracy Georgieva i Kosev (2016) nad łubinem białym i żółtym otrzymano silną korelację fenotypową pomiędzy wysokością rośliny a długością pędu u *Lupinus albus*. Autorzy Guilengue i in. (2019) stawiają tezę, że omawiana cecha ma znaczenie, ponieważ roślinie łatwiej adoptuje się do trudnych warunków klimatycznych.

Istotną korelację stwierdzono również dla takich cech jak: liczba okółków na pędzie głównym jak i liczba zawiązanych strąków na roślinie z długością kwiatostanu pędu głównego. Również dodatnią korelację potwierdzili badacze Lopez-Bellido i in. (2000) oraz Gonzalez-Andres i in. (2006). Elementy struktury plonu takie jak wysokość rośliny, liczba strąków na pędzie głównym i bocznym oraz masa 1000 nasion wpływają na plonowanie. W opublikowanych pracach badaczy, liczba strąków na roślinie miała duży wpływ na plonowanie. Stwierdził to również Turkec (2005), który otrzymał podobne wyniki w badaniach nad soją.

W niniejszej pracy zastosowana analiza składowych głównych, przeprowadzona na podstawie badanych cech użytkowych wykazała, że dwie składowe główne wyjaśniają 74,7 % zmienności. Cechy takie jak długość pędu głównego, całej rośliny oraz masa tysiąca nasion miały największy udział w tworzeniu składowych głównych podobnie jak u Galek i in. w pracy nad *L. mutabilis* (2017). Analiza składowych głównych utworzona dla badanych cech pozwoliła na wyodrębnienie trzech składowych. W pracy wykazano, że wysoki udział w pierwszej składowej głównej miały między innymi wysokości pędu głównego, a zmienność dla analizowanych cech wynosiła 77,53%. Zbliżony zakres całkowitej zmienności (75,8%) otrzymali Zalewski i in. (2015). Badacze przeanalizowali 20 cech u roślin z rodzaju *Lupinus*, a trzy z nich były istotne. Największy udział dla pierwszej składowej miały cechy: długość rośliny oraz fazy fenologiczne. Natomiast w kolejnej pracy Zalewski i in. (2013) dotyczącej badań wielocechowej statystycznej analizy kolekcji łubinu wąskolistnego, analiza składowych głównych, oparta była na 15 wyodrębnionych cechach i wynosiła 77,7 %. Badania wykazały, że najbardziej na obserwowaną zmienność genotypów wpływały liczba strąków i kwiatów na pędzie bocznym.

W niniejszej pracy przeprowadzona analiza pozwoliła na wyróżnienie genotypów skrajnych. Obiekty te mogą być ciekawe z punktu widzenia hodowcy i posłużyć jako materiał do dalszych prac hodowlanych. Wśród analizowanych linii, na uwagę zasługuje wyodrębniony klaster trzeci, który w 97% obejmuje formy epigonalne i wyraźnie różnił się od dwóch pozostałych grup. Pod względem analizowanych cech wyróżniały się linie 332,268,324 oraz 333.

Podstawowym elementem badań była ocena linii populacji w stosunku do form rodzicielskich. Oceniając wysokość pędu głównego widać zdecydowane różnice, ponieważ odnotowane linie miały od 44 – 78 cm, z kolei u form rodzicielskich były to: 'Emir' - 55,7 cm, a u Lae-1 58,7 cm. W prowadzonych pracach hodowlanych zmierza się w kierunku uzyskania roślin niskich. Z podobnego założenia wychodzi Prusiński (2007), który stwierdza, że niższe

rośliny są lepsze, ponieważ ograniczają wyleganie, które może wpływać na obniżenie plonu. Wyniki własne wskazują, że korelacja pomiędzy wysokością a plonowaniem jest słaba, a to daje możliwość znalezienia, wśród wszystkich badanych linii, genotypy niskie, ale dobrze plonujące.

Wysokość u większości roślin użytkowych jest cechą silnie związaną z wpływem warunków klimatyczno- glebowych. Dostępność wody, która uwarunkowana jest opadami atmosferycznymi wpływa na rozwój roślin i ich plonowanie. Zgonie z podaną literaturą łąbin należy do grupy, która jest wrażliwa na niedobór wody w glebach [Jasińska i Kotecki 2020]. W roku 2018 w miesiącach maj - lipiec odnotowano najniższą sumę opadów w stosunku do dwóch poprzednich lat. Według współczynnika hydrotermicznego Sielianinowa (Tabela 4a) wskazane miesiące w roku 2018 były suche, a nawet skrajnie suche (czerwiec).

Średnia wysokość z trzech lat prowadzonych badań u łąbinu wąskolistnego nie przekraczała 60 cm. Analizując dane z COBORU (2016-2018) wysokość wszystkich zarejestrowanych odmian sięgała kolejno: 60 cm, 52cm, a 2018 roku -51cm. Zbliżone wyniki otrzymała Galek i in. (2004), gdzie średnia wysokość łąbinu wąskolistnego z dwóch lat doświadczenia wyniosła 54,2 cm. Według Cowlinga i in. (1998) pod względem wysokości roślin wszystkie gatunki rodzaju *Lupinus* odznaczają się szerokim zakresem zmienności. Autorzy dodają, że *L. angustifolius* L. charakteryzuje się dużą zmiennością (od kilku do 180 cm, średnio 85 cm) na przykład w stosunku do łąbinu białego (40-200 cm, średnio 124 cm). Według Galek i Sawickiej- Sienkiewicz (2004) ze wszystkich gatunków łąbinu najwyższy jest łąbin andyjski. Badane przez Augiewicz i in. (2001) roku genotypy *L. mutabilis* osiągały od 127 do nawet 141 cm, z kolei publikacja Galek i in. (2006) podaje wysokość rzędu 112,1 cm.

Jak podaje literatura (Kozak i in. 2010, Panasiewicz i in. 2013) rozgałęziające się formy tradycyjne łąbinu tworzą dużą ilość masy wegetatywnej, ale zbyt liczne rozgałęzienia mogą skutkować opóźnieniem i nierównomiernością w dojrzewaniu strąków. Dlatego prace hodowlane były ukierunkowane na otrzymanie form o zdeterminowanym typie wzrostu z ograniczoną liczbą rozgałęzień bocznych lub form epigonalnych. Obie formy nie dorównują plenności odmianom tradycyjnym, ale ze względu na równomierność dojrzewania strąków są bardziej przydatne w uprawie. Analizując badania własne stwierdzono, że większość linii w analogicznym doświadczeniu ma liczbę rozgałęzień produktywnych pierwszego rzędu mniejszą niż 3, natomiast u formy rodzicielskiej Emir – 4. Doświadczenie prowadzone przez Galek i Sawicką – Sienkiewicz (2002 i 2004) wykazuje duże zróżnicowanie pod względem badanej cechy, podobnie jak w niniejszej pracy, gdzie współczynnik zmienności wynosił

37%. W charakteryzowanym przez nie materiale łubin wąskolistny osiągał od 5-8 rozgałęzień produktywnych pierwszego rzędu. W pracy własnej tylko pięć linii charakteryzowały się zbliżonym wynikiem.

U form rodzicielskich długość kwiatostanu pędu głównego wynosiła - 'Emir' – 17,2 cm a u Lae-1 – 25 cm. Dla pozostałych linii wartości tej cechy to średnio 22 cm. Zbliżone wyniki uzyskali Galek i in. 2006, gdzie najdłuższym kwiatostanem pędu głównego miała odmiana Boruta (25 cm). Z kolei u Zalewskiego i in. (2013) wartość u tej cechy wynosiła 18,9 cm. Spośród 108 linii wsobnych (RILs) *L. angustifolius* tylko 45% stanowią rośliny o pokroju tradycyjnym z licznymi pędami bocznymi. U tych form średnia długość kwiatostanu pędu bocznego wynosiła 6,8 cm, natomiast forma rodzicielska 'Emir' miała tylko 1,3 cm więcej. W publikacji Galek i in. (2006) najdłuższy kwiatostan pędu bocznego u łubinu wąskolistnego odnotowano u odmiany Baron – 7,7 cm.

Przeprowadzając syntezę wyników uzyskanych w latach 2016- 2018 dla 108 linii RILs wykazano, że istnieje zależność pomiędzy długością kwiatostanu a liczbą okółków. Liczba okółków zarówno na pędzie głównym jak i na pędzie bocznym może decydować o liczbie zawiązywanych strąków a nawet o plonie. Współczynnik zmienności dla badanych cech był wysoki i wynosił: V%- 50,5 dla pędu głównego i V%- 41,5 dla pędów bocznych.

Jednym z czynników wpływających na zawiązywanie strąków jest temperatura. Zbyt wysoka temperatura może przyspieszać kwitnienie, a dalej zawiązywanie i dojrzewania strąków na pędach. Badania nad łubinem żółtym prowadzone przez Podleśnego i Podleśną (2012) pokazują, że w podwyższona temperatura w okresie kwitnienia wpływa na ich mniejszą liczbę. Tego zjawiska nie zaobserwowano u roślin rosnących w optymalnych warunkach. W niniejszym doświadczeniu temperatura w okresie wegetacyjnym utrzymywała się na podobnym poziomie i nie wpłynęła znacząco na kwitnienie oraz zawiązywanie strąków. Rozpatrując średnia liczbę zawiązywanych strąków wszystkie linie (6,2) miały zbliżoną ilość do formy matecznej Lae-1 (6,9). Zbliżony wynik otrzymali Galek i in. (2004), którzy oceniali płodność u wybranych odmian i rodów łubinu wąskolistnego. Badana przez nich linia Lae-1 uzyskała średnio 6,4 zawiązanych strąków. Druga forma rodzicielska – 'Emir' uzyskała średnio 5,4 zawiązanych strąków na pędzie głównym, podobnie jak 'Emir' w badaniach Galek i in. (2004), gdzie analizowana odmiana miała ich 5,14.

Należy też zwrócić uwagę na liczbę zawiązanych strąków u form tradycyjnych. U wszystkich badanych linii średnia ich liczba była dwa razy mniejsza niż na pędzie głównym. I wynosiła -2,8. Dane skonfrontowano z wynikami uzyskanym przez Galek i in. (2006).

Jednym z głównych założeń produkcji roślinnej, jest uzyskanie wysokiego plonu o dobrej jakości. Analizując cechy struktury plonu warto zauważyć, że różnica w plonowaniu pomiędzy poszczególnymi genotypami jest duża, przy zmienności wynoszącej 22,5%. Najwyższy plon miał genotyp 248- 1,1 kg, zaś niskie plonowanie potwierdził genotyp 330 – 0,2 kg. Zbliżone wyniki uzyskali Galek i in. (2021), którzy badali między innymi *L. angustifolius* L. pod względem wybranych cech morfologicznych i struktury plonu. U autorów w.w. publikacji najwyższy plonujący genotyp osiągnął 1,19 kg, a najmniej (biorąc pod uwagę trzyletnie badania) - 0,28 kg, przy współczynniku zmienności wynoszącym 26,7%. W pracy własnej jak i w pracy Galek i in. (2021) współczynnik był wyższy, niż w pracu u Georgieva i in. (2016) – 12,59%. Średnia z poletka wyniosła 0,6 kg. Podobny wynik uzyskały formy rodzicielskie. Formy tradycyjne ze względu na wytwarzane rozgałęzienia nierównomiernie dojrzewają przez co plon jest mniej stabilny. Częściowym rozwiązaniem problemu miało być stworzenie odmian o epigonalnym typie wzrostu, który mimo niższej plenności był bardziej stabilny [Stawiński 2007]. Bieniaszewski i in. (2012) w swoich badaniach wskazują, że łubin o tradycyjny typie wzrostu plonował lepiej niż ten o pokroju epigonalnym. W niniejszej pracy nie stwierdzono istotnych różnic u linii obu form. Do podobnych wyników doszli Jarecki i Bobrecka–Jamro (2012), u których również nie odnotowano różnicy w plonie pomiędzy formą epigonalną a tradycyjną.

Czynnikiem, który może wpływać na plonowanie jest masa 1000 nasion. Jak podają Jasińska i Kotecki (2020) średnia masa 1000 nasion u trzech gatunków z rodzaju *Lupinus* wynosi dla: *L. angustifolius* 100- 130 g, *L. luteus* 120 -140 g i *L. albus* 240 g – 290 g. Po zestawieniu danych literaturowych z wynikami własnych badań można stwierdzić, że MTN łubinu wąskolistnego jest nieznacznie wyższa niż podają to autorzy. Średnia wartość badanej cechy wyniosła 145,5 g. Otrzymane wyniki są zgodne z danymi COBORU, gdzie w latach 2016 i 2017 średnia wyniosła 145 g. W kolejnym roku było to 142g. Współczynnik zmienności dla tej cechy był na poziomie 4,7 %, podobnie jak u Georgieva i in. (2016) – 4,73% (*L.luteus* L.) i 5,66% (*L. albus* L.).

Cechy jakościowe plonu takie jak: białko ogólne, alkaloidy czy zawartość tłuszczu są zdaniem wielu autorów jednym z najważniejszych elementów określającą wartość gospodarczą odmian [Jasińska i Kotecki 2020, Pastuszewska i Smulikowska 2001, Wiatr i in. 2007]. Nasiona łubinu zawierają dużą ilość cennych składników, które są potrzebne ludziom jako dobra alternatywa w żywieniu. Również dla zwierząt nasiona łubinu dają wiele korzyści. Obok grochu i bobiku są elementem wysokobiałkowym. Deficyt uzupełniany jest importem w postaci śruty sojowej (70%) [Podleśny 2005, Rutkowski i Jankowski 2011].

Zawartość białka w nasionach u wszystkich zarejestrowanych odmian łubinu wąskolistnego w Polsce w latach 2016-18 wahała się między 30,1 - 28,8 % (COBORU 2017-2019). W doświadczeniu własnym procentowa zawartości białka wskazują, iż mimo niskiego współczynnika zmienności (4,8%) warto zwrócić uwagę na znaczną różnicę pomiędzy wartością minimalną a maksymalną. Najwyższą zawartość białka miał genotyp 225 – 35,9%, a najniższą genotyp 333 – 24,7%. Brak wyraźnych różnic w zawartości białka widać w doświadczeniu nad łubinem wąskolistnym u Wiatr i in. (2007) i Rybińskiego i in. (2013). Średnia zawartość tego parametru u Wiatr i in. wynosiła 31,2 %, natomiast u Rybiński i in. (2013) – 31%. Do podobnych wniosków doszli również Podleśny i Strobel (2006) oraz Sienkiewicz i in. 2003. Dla porównania w badaniach Rybińskiego (2013) sprawdzono również zawartość białka u pozostałych gatunków z rodzaju *Lupinus*: *L. albus* (28% i 31%), *L. luteus* (ok. 40%) oraz *L. mutabilis* (44,2% i 41,3%).

Istotną cechą jakościową jest też ilość tłuszczu w nasionach. To właśnie ten parametr ma niemały wpływ na trwałość produktu. Jak podaje Harper i Jakobson 2002 tłuszcz zawarty w nasionach roślin strączkowych składa się m.in. z kwasu linolowego oraz linolenowego. Składniki te są niezbędne w diecie przeciwmiażdżycowej. Tłuszcz pochodzący z nasion ma też ogromne znaczenie w żywieniu zwierząt hodowlanych. Grochowicz i in. (2003) podaje, że średnia zawartość tego składnika w nasionach łubinu oscyluje na poziomie 4-9%. Z danych pochodzących z COBORU (2017-2019) średnia zawartość tłuszczu w nasionach w latach 2016-2018 u zarejestrowanych odmian *L. angustifolius* wynosiła 6,6- 7,1 %. Zbliżone wyniki uzyskali Wiatr i in. (2007) w swoich badaniach (średnio 8,65%), gdzie najlepsza okazała się odmiana Zeus (7,93%). Zestawiając dane z innymi łubinami widać znaczące różnice między nimi. Zawartość tłuszczów w nasionach u łubinu białego wynosi ok.11% a u łubinu żółtego tylko 6,1%. Podobne wyniki uzyskali Faligowska i in. (2016) oraz Faligowska i Szukała (2007). W przeprowadzonych badaniach własnych największą zawartość tłuszczu w nasionach odnotowano w 2016 roku – 8,9%. W ciągu kolejnych dwóch lat wartość tego parametru spadła o ponad 1 %. Współczynnik zmienności dla tej cechy, podobnie jak w przypadku procentowej zawartości białka, był niski i wynosił 5,3%.

Jak do tej pory jedyną Polską populacją mapującą wykorzystaną do wygenerowania mapy genetycznej była populacja Emir x Lae-1. Fenotypowanie i genotypowanie zostało przeprowadzone w pracy Kozak (2014). Badania miały na celu opis zmienności cech morfologicznych, a uzyskane wyniki pozwoliły autorowi na identyfikację obszarów QTL i markerów przydatnych w dalszych pracach genetyczno- hodowlanych. Wartości otrzymane dla analizowanych cech morfologicznych badanych linii z populacji mapującej były

porównywalne do własnych wyników. Szczególnie należy zwrócić uwagę na takie cechy jak: długość kwiatostanu pędu głównego, gdzie u analizowanych genotypów wartość mieściła się w przedziale 13-31 cm (Kozak) i 10,6-40,6 cm (praca własna) lub liczba okółków na pędzie głównym (7-15 szt. Kozak, 6,5-14,8 szt. praca własna). Autor w swoich badaniach wykazuje istotną zależność pomiędzy wyżej wymienionymi cechami. Zwraca również uwagę, że liczba okółków ma znaczenie w przypadku zawiązywania strąków i późniejszego plonowaniu. W pracy własnej również stwierdzono istotną zależność pomiędzy długością kwiatostanu a liczbą okółków. Po przeanalizowaniu wyników można zauważyć, że zmienność badanych linii jest na podobnym poziomie i zebrane wyniki własne mogą być wykorzystane do badań genetyczno-hodowlanych.

2. Możliwość indukcji roślin haploidalnych u łubinu wąskolistnego na drodze krzyżowania oddalonego oraz androgenezy

U łubinu jak do tej pory krzyżowanie oddalone było przeprowadzane, w celu albo zbadania barier krzyżowalności w doświadczeniach pod kątem zależności filogenetycznych [Wink i in. 2000], ale też możliwości otrzymania mieszańców międzygatunkowych pod kątem poprawy właściwości użytkowych [Boersma i in. 2005, Valente i in. 2004, Wilson i in. 2008]. Badania związane z otrzymywaniem mieszańców oddalonych w rodzaju *Lupinus* nie dały jednoznacznej odpowiedzi czy mamy do czynienia z procesem haploidyacji czy otrzymywaniem mieszańców oddalonych [Przyborowski i Packa 1997, Przyborowski 2003, Wilson i in. 2008, Galek 2010].

Niewielu badaczy podjęło się wnikliwej obserwacji kiełkującego pyłku na znamieniu i wzrostu łagiewki pyłkowej u krzyżowanych gatunków z rodzaju *Lupinus*. Williams i in. (1980), jako jedni z pierwszych ocenili zgodność w krzyżowaniu między gatunkami pochodzącymi z Europy a łubinem andyjskim. Swoją ocenę oparli na podstawie obserwacji zdolności kiełkowania oraz wzrostu łagiewki pyłkowej badanych roślin. Podobną analizę przeprowadził Przyborowski (2003), któremu udało się zidentyfikować bariery w krzyżowaniu łubinu wąskolistnego, łubinu białego i andyjskiego. Również Galek (2010) w swojej pracy podjęła się określenia możliwości krzyżowania wybranych przedstawicieli z sekcji *Albus* i *Atlanticus*. Przeprowadzona w badaniach przez autorkę analiza procesu zapylenia dowodzi istnienie barier postzygotycznych. Najwyższy udział słupków z łagiewkami wnikającymi w głąb szyjki odnotowano w trzech kombinacjach krzyżowań. Z kolei u dwóch układów krzyżowań: *L. atlanticus* x *L. cosentinii* i *L. cosentinii* x *L. atlanticus*

stwierdzono najlepszą efektywność w zawiązywaniu nasion. Niniejsze doświadczenie pozwoliło na ocenę zachowania się pyłku trzech gatunków łubinu żółtego na znamionach czterech genotypów łubinu wąskolistnego. Pyłek obcego gatunku osadzał się na znamieniu, kielkował i docierał do zalążka u wszystkich badanych genotypów w różnym stopniu nasilenia (Wykres 18). Część niniejszej pracy, miała na celu przeanalizowanie możliwości indukcji rozwoju struktur z woreczka zalążkowego pod kątem indukcji struktur haploidalnych – zarodków czy też tkanki kalusowej.

Przyborowski i Packa (1997) w swoich badaniach podjęli próbę otrzymania roślin poprzez krzyżowanie trzech gatunków łubinów: białego, andyjskiego oraz wąskolistnego, o zróżnicowanej liczbie chromosomów – $2n = 50$, $2n = 48$, $2n = 40$ odpowiednio. W każdym układzie krzyżowaniu uzyskano zarodki. Niektóre z nich w kulturach *in vitro* przekształciły się w rośliny, ale z uwagi na zniekształcone korzenie i łodygi większość obumarła. Podobne badania prowadzili Williams i in. (1980). Niestety otrzymane rośliny poprzez krzyżowanie gatunków pochodzących ze Starego i Nowego Kontynentu nie wytworzyły żywotnych nasion. W doświadczeniu własnym uzyskane zalążki z krzyżowania dobrze reagowały na zastosowany zapylacz (łubin żółty). U badanych eksplantatów zaobserwowano kalus po ok. 30 dniach od wyłożenia na podłoże hodowlane. Dodatkowo u linii Lae-1 po 14 dniach od założenia doświadczenia zaobserwowano zaczątki korzenia (Zdjęcie 5). Regenerujący kalus otrzymano również w badaniach Galek i in. (2019). Uzyskany przy wykorzystaniu krzyżowania oddalonego kalus był na poziomie ploidalności $2x$ i $1x$. Ciekawe rezultaty uzyskali Ślusarkiewicz- Jarzina i in. (2017), którzy skrzyżowali ze sobą trzy gatunki łubinu: wąskolistnego, żółtego oraz białego. Ze skrzyżowania *L. luteus* z *L. albus* oprócz tkanki kalusowej otrzymali zaczątki regeneracji roślin.

Wielu badaczy skupiających się na możliwości haploidyzacji roślin strączkowych podkreśla jak trudny jest to proces [Bayliss 2004, Skrzypek 2008, Kozak 2012]. Dlatego, aby uzyskać skuteczną metodę otrzymywania haploidów, a następnie podwojonych haploidów u gatunków z rodzaju *Lupinus* należy poświęcić się badaniom nad roślinami, u których udało się osiągnąć zamierzony efekt. Skuteczne procedury uzyskano przy doświadczeniach prowadzonych na zbożach takich jak: pszenica, pszenżyto lub jęczmień [Lantos i in. 2018, Orłowska i in. 2019, Zimny i in. 2019]. W celu poprawienia wydajności procesu androgenezы badacze skupili się nad wybraniem odpowiedniej fazy rozwojowej kultur [Orłowska i in. 2019]. Kozak i in. (2012) stwierdzają, że stadium rozwoju ziaren pyłku w znacznym stopniu zależy od lokalizacji pąka w kwiatostanie. Dodają, że kolor pylników i żywotność mikrospor ma ogromne znaczenie przy indukcji i dalszemu rozwojowi kultur. Z przeprowadzonych

obserwacji mikrospor łubinu wąskolistnego najlepsze okazało się stadium jedno lub dwujądrowe z pylników środkowej części kwiatostanu. Prowadzone badania własne potwierdzają założenia badaczy. Wyizolowane mikrospory ze środkowej części kwiatostanu *L. angustifolius* miały postać jedno i dwujądrowych oraz sporadycznych tetrad.

Jednym ze sposobów na pobudzenie mikrospor do indukcji jest zastosowanie czynnika stresującego. Do najczęstszych terapii stresowych w początkowej fazie prowadzenia kultur mikrospor stosuje się niską lub wysoką temperaturę czy głód w postaci ograniczenia węglowodanów lub azotu [Żur i in. 2008]. W doświadczeniu prowadzonym przez Żur i in. (2008) brak termicznego czynnika powodował degradację mikrospor wyizolowanych kłosów pszenicy. Te mikrospory, które były w obniżonej temperaturze (4°C) charakteryzowały się żywotnością zarówno podczas izolacji jak i późniejszego przeniesienia do kultur *in vitro*. Do innych wniosków z kolei doszli Ormerod and Caligari (1994), Skrzypek i in. (2008) oraz Kozak i in. (2012). Mimo niskiej (4°C w ciemnym miejscu) lub wysokiej (32°C przez 1-3 dni) temperatury żywotność izolowanego materiału pozostawała taka sama. Ochatt i in. (2009) badając wpływ temperatury na mikrospory *Medicago truncatula*, stwierdzają jego negatywny wpływ, skutkiem czego była degradacja materiału. W niniejszym doświadczeniu temperatura, tak jak i u wspomnianych autorów badających łubin, nie wpłynęła na indukcję czterech badanych genotypów w kulturach *in vitro*. Największym sukcesem w kulturach mikrospor u roślin z rodzaju *Lupinus* było otrzymanie struktur wielokomórkowych [Kozak 2012, Simioniuc i in. 2010, Galek i in. 2019] oraz kalusów [Skrzypek i in. 2008]. Efektem badań własnych nad łubinem wąskolistnym było osiągnięcie tak jak u poprzedników uzyskanie struktur wielokomórkowych (Zdjęcie 13). Ze względu na trudności w indukcji kultury żadna ze struktur nie przekształciła się w haploidalną roślinę.

3. Uzyskanie kilku pokoleń łubinu wąskolistnego w oparciu o metodę pojedynczych nasion (SSD)

Linie homozygotyczne można uzyskać w stosunkowo krótkim czasie nie tylko dzięki technice haploidytacji *in vitro*, a następnie indukowanych podwójnych haploidów, ale i metodzie pojedynczych nasion (*Single Seed Select*). Z uwagi na niską efektywność uzyskania form haploidalnych za pomocą androgenyzy i gynogenyzy u roślin strączkowych, alternatywą staje się procedura kilku pokoleń w ciągu jednego roku (SSD) [Rybczyński i in. 1993, Surma i in. 2015, Surma i in. 2013, Świącicki i in. 2000]. Dodatkowym atutem linii SSD u gatunków strączkowych może być osiągnięcie statusu odmiany uprawnej, dzięki ocenie ich wartości

agronomicznej w stacjach hodowlanych [Surma i in. 2015]. Technika pojedynczych nasion skutecznie jest wykorzystywana między innymi w badaniach nad jęczmieniem ozimym, gdzie cały proces hodowli przyspieszono o 4 miesiące [Surma i in. 2011] oraz przy pszenicy zwyczajnej [Adamski i in. 2014]. W niniejszej pracy stosując SSD otrzymano trzy pokolenia łubinu wąskolistnego w ciągu roku. W pracy podjęto się przyspieszenia procesu pobierając materiał już po 14 dniach od kwitnienia, ale nie przyniósł on spodziewanego efektu. Również w opublikowanym doniesieniu przez Wilson i in. (2008) badane zarodki (14 dni) łubinu wąskolistnego były słabo wykształcone. Dużym sukcesem w badaniach własnych okazało się stadium 28 dniowe w połączeniu z metodą kultur *in vitro*. Podobne rezultaty uzyskali Surma i in. (2015). Dzięki metodzie SSD otrzymali 2,5- 3 pokoleń łubinu wąskolistnego oraz łubinu żółtego. Badacze dodają, że stosując technikę pojedynczych nasion w ciągu 3 lat otrzymali 9 pokoleń grochu siewnego. Prowadzone równolegle hodowla metodą tradycyjną pozwoliła na uzyskanie jedynie czterech pokoleń. Potwierdza to Ochatt i Sangwa (2010), którzy otrzymali maksymalnie 3 pokolenia grochu w ciągu jednego roku. Z kolei Pazos-Navarro i in. (2017) omawianą technikę zastosowali u *Trifolium subterraneum* L.. Dzięki odpowiedniemu stadium zbioru i wysiewu nasion w połączeniu z kulturami *in vitro* przeszli z pokolenia F₄ do F₇.

VIII. Wnioski

1. 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.
2. Analizując wszystkie wyniki badań stwierdzono silną korelację pomiędzy wysokością pędu głównego a wysokością całej rośliny oraz długością kwiatostanu a liczbą okółków.
3. 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.
4. Pyłek obcego gatunku, który został wykorzystany do krzyżowania oddalonego kiełkował i docierał do zalążka czterech badanych genotypów łubinu wąskolistnego. Na podstawie analiz histochemicznych stwierdzono, że proces przebiegał w różnym nasileniu, a efektem finalnym było zapoczątkowanie zarodka. Dla indukcji rozwoju zarodka najlepszym źródłem pyłku był *L. luteus 501*. Największą ilość zalążków z widocznymi zmianami po 30 dniach obserwacji odnotowano u odmiany Karo i Emir.
5. Najlepszym stadium do zakładania kultury mikrospor jest stadium jednojądrowe znajdujące się w środkowej części pąka.
6. Obniżenie temperatury w celu pobudzenia mikrospor do indukcji w kulturach *in vitro* nie wpłynęło znacząco na proces. Mikrospory rozwijały się w podobnym tempie niezależnie od zastosowanego czynnika stresowego. Najwięcej struktur wielokomórkowych u obserwowanych mikrospor miał 'Graf' na podłożu B5 oraz B5+0,5 mg·dm⁻¹ BA i 'Karo' na podłożu B5.
7. Rozwój zarodków zygotycznych po 14 dniach od kwitnienia (stadium A) nie przyniósł spodziewanego efektu, jak w przypadku materiału pobranego po 28 dniach (stadium B). Zarodki zygotyczne (stadium B) podjęły regenerację, czego efektem był rozwój rośliny.
8. 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.

IX. Bibliografia

1. **Adamski T., Krystkowiak K., Kuczyńska A., Mikołajczak K., Ogradowicz P., Ponitka A., Surma M., Ślusarkiewicz-Jarzina A.** 2014. Segregation distortion in homozygous lines obtained via anther culture and maize doubled haploid methods in comparison to single seed descent in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Electronic Journal of Biotechnology*. 17:6-13.
2. **Adhikari K.N., Galwey N.W., Dracup M.** 2001. The genetic control of highly restricted branching in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Euphytica*. 117:261–274.
3. **Alarcon M., Bustos M., Mendez D., Fuentes E., Palomo I., Lutz M.** 2020. *In Vitro* Assay of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and Lupin (*Lupinus spp.*) Extracts on Human Platelet Aggregation. *Plant Foods for Human Nutrition*. 1-8.
4. **Annicchiarico P., Manunza P., Arnoldi A., Boschini G.** 2015. Quality of *Lupinus albus* L. (White Lupin) Seed: Extent of Genotypic and Environmental Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62:6539–6545.
5. **Aslam M.M., Karanja J.K., Zhang Q., Lin H., Xia T., Akhtar K., Liu J., Miao R., Xu F., Xu W.** 2020. *In Vitro* Regeneration Potential of White Lupin (*Lupinus albus*) from Cotyledonary Nodes. *Plants*. 318 :1-14.
6. **Augiewicz J., Sawicka-Sienkiewicz E., Kępa E.** 2001. Wstępna ocena materiałów pochodzących ze skrzyżowania łubinu andyjskiego (*Lupinus mutabilis* Sweet) z przedstawicielami sekcji Albus. Część I. Analiza morfologiczna. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu. Rolnictwo LXXXII*. 427:19– 30.
7. **Baer von E.** 2004. The potential of crossing *Lupinus polyphyllus* and *L. mutabilis*. *Proc. Of the 10th int. Lupine Conference Laugarvatn, Iceland 19-24 June 2002*. 153-158.
8. **Barbacki S.,** 1975. *Rośliny strączkowe*. W: *Uprawa roślin*. Red. A. Listowski i in. (praca zbiorowa). PWRiL. Warszawa. 571.
9. **Barczak B., Nowak K., Kozera W., Knapowski T, Ralcewicz M.** 2013. Reakcja łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.) na nawożenie siarką cz. II. Zawartość i plon tłuszczu w nasionach. *Fragmenta Agronomica*. 30(2):35–41.
10. **Bayer R. J., Ainouche A.K.** 1999. Phylogenetic relationships in lupinus (*Fabaceae: Papilionoideae*) based on internal transcribed spacer sequences (its) of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany*. 86(4):590–607.

11. **Bayliss K.L., Wroth J.M., Cowling W.A.** 2004. Pro-embryos of *Lupinus spp.* produced from isolated microspore culture. Australian Journal of Agricultural Research. 55:589–593.
12. **Bieniaszewski T., Podleśny J., Olszewski J., Stanek M., Kaszuba M.** 2012. Reakcja łąbinu wąskolistnego form tradycyjnych i samokończących na zróżnicowaną obsadę roślin. Fragmenta Agronomica. 29(4):21–35.
13. **Binkowski M., Osiecka A., Paczocha J., Stuczyńska E.** 2019. Lista opisowa odmian roślin rolniczych. Bobowate, soja inne pastewne. Wydawnictwo COBORU. 155:39-52.
14. **Blaydes D.F.** 1996. Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissues. Journal of Plant Physiology. 19:748–753.
15. **Boersma J.G., Pollotta M., Li.C., Buirchell B.J., Sivasithamparam K., Yang H.** 2005. Construction of genetic linkage map using MFLP and identification of molecular markers linked to domestication genes in narrow- leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L). Cellular & Molecular Biology Letters. 10:331–344.
16. **Boros L., Stawiński S.** 2012. Znaczenie Hodowli w integrowanej ochronie łąbinu. W: Metodyka integrowanej ochrony łąbinu wąskolistnego, żółtego i białego. Instytut Ochrony Roślin Państwowy Instytut Badawczy. Poznań. 112–119.
17. **Bujak H., Dopierała A., Dopierała P., Nowosad K.** 2006. Analiza intrakcji genotypowo- środowiskowej plonu odmian żyta ozimego. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin. 240/241:151-160.
18. **Buraczyńska D.** 2010. Porównanie plonowania i zawartości białka mieszanek owsa oplewionego i łąbinu wąskolistnego. Żywność Nauka, Technologia, Jakość. 3(70):160–173.
19. **Chen Y.L., Dunbabin V.M., Postma J.A., Diggle J., Palta J.A., Lynch J.P., Siddique K.H.M., Rengel Z.** 2011. Phenotypic variability and modelling of root structure of wild *Lupinus angustifolius* genotypes. Plant Soil. 348:345–364.
20. **Clements J.C., Dracup M., Buirchell B., Smith C.** 2005. Variation for seed coat and pod wall percentage and other traits in agermplasm collection and historical cultivars of lupins. Australian Journal of Agricultural Research. 53:75-83.
21. **Cowling W.A., Buirchell B., Tapia M.E.** 1998. Lupin. *Lupinus* L. promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. IPK/IPGRI. 23:1–105.
22. **Croser J.S., Lulsdorf M.M., Davies P.A., Clarke H.J., Bayliss K.L., Mallikarjuna N., Siddique K.H.M.** 2006. Toward Doubled Haploid Production in the *Fabaceae*:

- Progress, Constraints, and Opportunities. *Critical Reviews in Plant Science*. 25:139–157.
23. **Czaplicki A.Z.** 2006. Androgeneza– wczoraj i dziś. Haploidy i linie podwojonych haploidów w genetyce i hodowli roślin. Centre of Excellence in Plant Agrobiolgy and Molecular Genetics. Poznań. 47-55.
 24. **Daza A., Chamber M.A.** 1993. Plant regeneration from hypocotyl segments of *Lupinus luteus* cv. L. Aurea. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*.34:303–305.
 25. **Dzwonkowski W.** 2016. Analiza sytuacji na krajowym rynku pasz białkowych w kontekście ewentualnego zakazu stosowania materiałów paszowych GMO. *Roczniki Naukowe Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu*. 18 (3):47–52.
 26. **Faligowska A., Panasiewicz K., Szymańska G., Szukała J., Koziara W., Świącicki H.** 2016. Produkcyjne i ekonomiczne efekty uprawy niektórych roślin strączkowych w warunkach bezorkowej uprawy roli. *Fragmenta Agronomica*. 33(3):18–26.
 27. **Faligowska A., Szukała J.** 2007. Wydajność i jakość paszowa trzech gatunków łubinu uprawianych na kiszonkę. *Zeszyty. Nauk Problemowych*. 522:229-238.
 28. **FAOSTAT.** 2021. [www. faostat.org](http://www.faostat.org).
 29. **Filutowicz A., Kuźdowicz A.** 1951. Mikrotechnika roślinna. PWRiL. Warszawa.
 30. **Florek J.** 2017. Możliwości wykorzystania roślin strączkowych do produkcji pasz w Polsce (Potential utilization of legumes in feed production in Poland). *Roczniki Naukowe*. (4):40-45.
 31. **Forster P.B., Heberle-Bors E., Kasha J. K., Touraev A.** 2007. The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plants Science*. Vol.12. 8:368-375.
 32. **Galek R.** 2010. Studia nad zmiennością wybranych cech morfologicznych i użytkowych rodzaju *Lupinus*, ze szczególnym uwzględnieniem mieszańców wewnątrz i międzygatunkowych. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Monografie CVI.
 33. **Galek R., Kalińska H., Sawicka-Sienkiewicz E.** 2006. Analiza wybranych cech morfologicznych i struktury plonu w kolekcji łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L). *Biuletyn IHAR*. 240/241:243-252.
 34. **Galek R. , Kozak B., Sawicka–Sienkiewicz E., Zalewski D., Nowosad K.,** 2017. Searching for the mosy useful genotypes of *Lupinus Mutabilis* Sweet for breeding purpose. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*. 20(4):1–9.
 35. **Galek R., Kozak B., Zalewski D.** 2021. Fenotypowanie i genotypowanie łubinu wąskolistnego pod względem wybranych cech morfologicznych, plonotwórczych i

- parametrów technologicznych nasion. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin. 295:435–440.
36. **Galek R., Kozak B., Zalewski D., Sawicka- Sienkiewicz E.** 2019. Preliminary Genetic Map of a New Recombinant Inbred Line Population for Narrow-Leafed Lupin (*Lupinus angustifolius* L). *Agronomy*. 653:1-20.
 37. **Galek R., Kozak B., Zalewski D., Sawicka- Sienkiewicz E., Adamus A., Kielkowska A.** 2019. Badania nad gametyczną embriogenezą u *Lupinus angustifolius* L. - indukcja haploidów i analiza genetycznego podłoża tego procesu. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*. 286:347-355.
 38. **Galek R., Sawicka- Sienkiewicz E.** 2001. Ocena form kolekcyjnych łubinów, pochodzących z różnych warunków geograficzno- klimatycznych, pod względem wybranych cech morfologicznych. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu*. 427:31-49.
 39. **Galek R., Sawicka–Sienkiewicz E. J.** 2002. Ocena gatunków z rodzaju *Lupinus* pod względem faz fenologicznych i wybranych cech morfologicznych. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*. 488:251-258.
 40. **Galek R., Sawicka–Sienkiewicz E. J.** 2004. Analiza zmienności gatunków z rodzaju *Lupinus* pod względem plonowania. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*. 497:259—267.
 41. **Galek R., Sawicka-Sienkiewicz E., Buzar M.** 2010. Mikrorozmnażanie wybranych przedstawicieli rodzaju *Lupinus* w kulturze merystemów. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*. 550:63-70.
 42. **Galek R., Sawicka–Sienkiewicz E.J., Zalewski D., Stawiński S. Spychała K.** 2017. Searching for low alkaloid forms in the Andean Lupin (*Lupinus mutabilis*) collection. *Journal of Plant Breeding and Genetics*. 53(2):55–63.
 43. **Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K.** 1986. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 50:151-158.
 44. **Georgieva N.A., Kosev V.I.** 2016. Analysis of Character Association of Quantitative Traits in *Lupinus Species*. *Journal of Agricultural Science*. 2016:8-23.
 45. **Georgieva N. A., Kosev V. I., Genov N. G., Butnariu M.** 2018. Morphological and biological characteristics of white Lupine cultivars (*Lupinus albus* L.). *Romanian Agricultural Research*. 35:109-119.
 46. **Gladstones J.S.** 1998. *Lupinus* as a crop plants. Distribution, history and importance. *Lupin as a CropPlants: Biology, Production and Utilization*. CAB International. 1-7.

47. **Gonzalez-Andres F., Casquero A. P., San-Pedro C., Hernandez-Sanchez E.** 2006. Diversity in white lupin (*Lupinus albus* L.) landraces from northwest Iberian plateau. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 54:27–44.
48. **Grela E.R., Czech A.** 2019. Pasze alternatywne w odniesieniu do soi genetycznie modyfikowanej w żywieniu zwierząt. *Wiadomości Zootechniczne*. 2:66–77.
49. **Grochowicz J., Andrejko D., Mazur J.** 2003. Określenie podstawowych właściwości fizycznych i chemicznych nasion polskich odmian łubinów. *Acta Agrophys.* 2(3):539–548.
50. **Gruszecka D.** 2006. Wykorzystanie krzyżowania oddalonego w hodowli pszenżyta i żyta. *Mieszanka Oddalone Roślin Uprawnych*. Instytut Genetyki Roślin PAN. 75-80.
51. **Guilengue N., Alves, S., Talhinhos, P., Neves-Martins, J.** 2019. Genetic and genomic diversity in a tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) germplasm collection and adaptability to Mediterranean climate conditions. *Agronomy*. 10:1-24.
52. **Gupta S., Ghosal K. K., Gadgil V. N.** 1972. Haploid tissue culture of *Triticum aestivum* var. Sonalika and *Pisum sativum* var. B22. *Indian Agriculturist*. 16(3):277-278.
53. **Hanczakowska E., Świątkiewicz M.** 2015. Zastosowanie nasion bobowatych (strączkowych) w mieszankach z produktami rzepakowymi jako zamiennika śruty sojowej w żywieniu świń. *Wiadomości Zootechniczne*. 53(3):163–172.
54. **Hane J.K., Ming Y., Kamphuis L.G., Nelson M.N., Garg G., Atkins C.A.** 2016. A comprehensive draft genome sequence for lupin (*Lupinus angustifolius*), an emerging health food: Insights into plant microbe interactions and legume evolution. *Plant Biotechnology Journal*. 15(3):318–330.
55. **Hamza M.A.** 2013. Effect of yeast extract (biotic elicitor) and incubation periods on selection of *Lupinus termis* explant *in vitro*. *Journal of Applied Sciences Research*. 9:4186-4192
56. **Hardy I., Grange I., Jouve L., Gaspar T.** 1995. Micropropagation of *Lupinus mutabilis*. In *AGRIS Since*. 1107 -1111.
57. **Harper Ch. R., Jacobson T. A.** 2002. Tłuszcze życia. Rola kwasów tłuszczowych omega-3 w zapobieganiu chorobie niedokrwiennej serca. *JAMA-PL*. 4:149–156.
58. **Hatano R., Lipiec J.** 2004. Effects of land use and cultural practices on greenhouse gas fluxes in soil. *Acta Agrophysica*. 111:5–51.

59. **Hejdysz M., Jerzak M.A., Kasprowicz- Potocka M., Mikula R., Księżak J., Rutkowski A., Stawiński S., Szukała J.** 2013. Uprawa roślin strączkowych w Polsce. Fundacja Programów Pomocy dla Rolnictwa FAPA. Warszawa. 2013.
60. **Hejdysz M., Kaczmarek S.A., Rogiewicz A., Rutkowski A.** 2018. Influence of graded dietary levels of seeds of three species of lupin on growth performance, nutrient digestibility, and intestinal morphology of broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*. 241:223-232.
61. **Hooghvorst I., Nogués S.** 2020. Chromosome doubling methods in doubled haploid and haploid inducer-mediated genome-editing systems in major crops. *Plant Cell Reports*. Springer. 10:2-17.
62. **Horoszkiewicz-Janka J., Korbas M., Jajor E., Krawczyk R.** 2011. Health of narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) cultivated in the conventional farming system and in transition period to the ecological system. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*. 55(3):143–146.
63. **Jarecki W., Bobrecka–Jamro D.** 2012. Wpływ zróżnicowanej ilości wysiewu nasion na rozwój i plonowanie łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.). *Annales Universitatis Mariae Curie– Skłodowska. Lublin– Polonia*. 69(2): 11–21.
64. **Jasińska Z., Kotecki A.** 2020. Szczegółowa uprawa roślin. Tom 3. Część VIII. Rośliny bobowate grubonasienne (strączkowe). Wydawnictwo AR we Wrocławiu.
65. **Jezierny D., Mosenthin R., Bauer E.** 2010. The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition. *Animal Feed Science and Technology*. 57:111–128.
66. **Jędryczka M., Kaczmarek J.** 2012. Porażenie nasion łubinu wąskolistnego znajdujących się w obrocie komercyjnym przez grzyby chorobotwórcze i saprotroficzne. *Fragmenta Agronomica*. 29(4):63–69.
67. **Juzoń K., Skrzypek E., Dziura M., Marcińska J.** 2012. Zmiany wartości żywieniowej roślin bobowatych w warunkach suszy glebowej. *Czasopismo naukowo–kulturalne. Episteme*. Kraków. 15:113-119.
68. **Kalandyk A., Waligórski P., Dubert F.** 2017. Role of the maternal effect phenomena in improving water stress tolerance in narrow-leaved lupine (*Lupinus angustifolius*). *Plant Breeding*. 136:167–173.
69. **Kapusta F.** 2017. Rola roślin strączkowych w rolnictwie polskim. *Zagadnienia z dworactwa rolniczego*. 1:68-78.
70. **Kasten W., Kunret R.** 1991. A culture method for isolated embryos of different *Lupinus species*. *Biol. Zent. Bl.* 110:290–300.

71. **Kasten W., Paradies T., Kunret R., Straka P.** 1991. Progress in realization of interspecific hybrids in the genus *Lupinus* by means of an embryo rescue technique. Biol. Zent. Bl. 110:290–300.
72. **Kazimierska E.M.** 1970. Sporogenesis and gametogenesis in the hybrids *Lupinus hartwegi* Lindl. X *L. pubescens* BenthII. Megasporogenesis and megagametogenesis. Genetica Polonica. 11:113-129.
73. **Kazimierski T.** 1961. Interspecific hybridization of *Lupinus*. Genetica Polonica. Polish Journal of Genetics and Plant Breeding. 2:97-102.
74. **Khan M.A., Shaukat S., Ahmad J., Kashif M., Khan A.S., Iqbal M.Z.** 2012. Use of intergeneric cross for production of doubled haploid wheat (*Triticum aestivum* L.). Science and Technology. 31 (4):295-300.
75. **Kole Ch.** 2011. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Legume Crops and Forages. Springer Heidelberg Dordrecht London New York. 291.
76. **Konieczka P., Smulikowska S.** 2017. Viscosity negatively affects the nutritional value of blue lupin seeds for broilers. Animal. 1–10.
77. **Koprowicz M., Święcicki W.,** 1985. Wartość użytkowa łąbinów Starego Świata. Hodowla Roślin. 5-6:32-36.
78. **Kozak B.** 2014. Charakterystyka markerów molekularnych przydatnych do selekcji wybranych cech u łąbinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.). Praca doktorska.
79. **Kozak B., Galek R., Zalewski D, Sawicka-Sienkiewicz E.** 2019. Preliminary Genetic Map of a New Recombinant Inbred Line Population for Narrow-leafed Lupin (*Lupinus angustifolius* L.) Agronomy. 9(10):1-20.
80. **Kozak K., Galek R., Sawicka- Sienkiewicz E.** 2012. Anther culture of *Lupinus angustifolius*: callus formation and the development of multicellular and embryo-like structures. Plant Growth Regulator. 66:145–153.
81. **Kozak K., Galek R., Sawicka–Sienkiewicz E., Zalewski D.** 2010. Wybrane elementy struktury plonu nasion w kolekcji łąbinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.). Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych. 550:105–111.
82. **Kozhahmetov K.K., Abugalieva I.A.** 2014. Using gene fund of wild relatives for common wheat improvement. International Journal of Biology and Chemistry. 2:41-42.
83. **Krawczyk R., Mrówczyński M.** 2012. Metodyka integrowanej ochrony łąbinu wąskolistnego, żółtego i białego dla doradców. Opracowanie zbiorcze. Instytut Ochrony Roślin. PIB, Poznań.

84. **Kroc M., Koczyk G., Święcicki W., Kilian A., Nelson M.N.** 2014. New evidence of ancestral polyploidy in the Genistoid legume *Lupinus angustifolius* L. (narrow-leaved lupin). *Theoretical and Applied Genetics*. 127:1237–1249.
85. **Kroc M., Święcicki W., Naganowska B., Kachlicki P., Wolko B.** 2011. QTL analysis of seed yield components and alkaloid content in *Lupinus angustifolius* L. In *Lupin crops: an opportunity for today, a promise for the future. Proceedings of the 13th International Lupin Conference, Poznan, Poland, 6-10 June 2011*. International Lupin Association. 104-107.
86. **Kumar A.S., Gamborg O.L., Nabors M.W.** 1988. Plant regeneration from cell suspension cultures of *Vigna aconitifolia*. *Plant Cell Reports*. 7:138-141.
87. **Kyo M., Harada H.** 1986. Control of the development pathway of babaco pollen *in vitro*. *Planta*. 168:427-432.
88. **Lammi C., Aiello G., Vistoli G., Zanoni C., Arnoldi A., Sambuy Y., Ferruzza S., Ranaldi G.** 2016. A multidisciplinary investigation on the bioavailability and activity of peptides from lupin protein. *Journal of Functional Foods*. 24:97–306.
89. **Lampart-Szczapa E., Czubiński J.** 2011. Niedoceniony łubin. Cenne właściwości roślin strączkowych. *Przemysłu Spożywczego*. 11(65):29–33.
90. **Lampart-Szczapa E., Łoza A.** 2007. Funkcjonalne składniki nasion łubinu – korzyści i potencjalne zagrożenia. *Zeszyty Problemów. Postępówych Nauk Rolniczych*. 522:387–392.
91. **Lantos C., Bóna L., Nagy E., Békés F., Pauk J.** 2018. Induction of *in vitro* androgenesis in anther and isolated microspore culture of different spelt wheat (*Triticum spelta* L.) genotypes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 133:385–393.
92. **Lazar M. D., Schaeffer G. W., Baenziger P.S.** 1990. The physical environment in relation to high frequency callus and plantlet development in anther cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris *Journal Plant Physiology*. 121(2):103-109.
93. **Leśniowska-Nowak J., Sozoniuk M., Okoń S., Nowak M., Sowa S., Marecki W., Koroluk A., Kawęcka M.** 2021. Wytwarzanie nowych źródeł genetycznych pszenżyta w oparciu o krzyżowanie oddalone. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*. 295:111–115.
94. **Lewis G, Schrirer B, Mackinder B, Lock M.** 2005. *Legumes of the world*. Royal Botanic Gardens Kew.

95. **Li X., Yang H., Yan G. 2012.** Development of a co-dominant DNA marker linked to the gene *lentus* conferring reduced pod shattering for marker-assisted selection in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius*) breeding. *Plant Breeding*. 131:540-544.
96. **Lopez-Bellido L., Fuentes M., Castillo J. E. 2000.** Growth and yield of white lupin under Mediterranean conditions: Effect of plant density. *Agronomy Journal*. 92:200-205.
97. **Magalhães S.C.Q., Fernandes F., Cabrita A.R.J., Fonseca A. J.M., Valentão P., Andradeb P. B. 2017.** Alkaloids in the valorization of European *Lupinus spp.* seeds crop. *Industrial Crops and Products*. 95:286–295.
98. **Mahato A., Chaudhary H. K. 2015.** Relative efficiency of maize and *Imperata cylindrica* for haploid induction in *Triticum durum* following chromosome elimination-mediated approach of doubled haploid breeding. *Plant Breeding*. 10:1-5.
99. **Maluszynski M., Kasha K., Forster P.B., Szarejko I. 2003.** Doubled haploid production in crop plants: a manual. Kluwer Academic Publisher. 195-204.
100. **Marcińska I., Nowakowska A., Skrzypek E., Czyczyło-Mysza I. 2013.** Production of double haploids in oat (*Avena sativa* L.) by pollination with maize (*Zea mays* L.). *Central European Journal of Biology*. 8(3):306-313.
101. **Martyniak J. 2000.** Geneza polskich odmian roślin strączkowych. *Hodowla Roślin i Nasiennictwo*. 1:49-54.
102. **Martyniak J. 1998.** Wykorzystanie materiałów wyjściowych w hodowli polskich odmian roślin strączkowych. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*. 463:575-590.
103. **Michalik B. 2009.** Zastosowanie kultur *in vitro*. W: *Hodowla roślin z elementami genetyki i biotechnologii*. Warszawa. 304-312.
104. **Murashige T., Skoog F. 1964.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473–497.
105. **Nadolska – Orczyk A. 1992.** Somatic embryogenesis of agriculturally important lupin species (*Lupinus angustifolius*, *L. albus*, *L. mutabilis*). *Plant Cell and Organ Culture*. 28:19-25.
106. **Naganowska B., Wolko B., Śliwińska E., Kaczmarek Z. 2003.** Nuclear DNA content variation and species relationships in the genus *Lupinus* (*Fabaceae*). *Annals of Botany*. 29:349-355.
107. **Nelson M.N., Boersma J., Chudy M., Leśniewska K., Ellwood S.R., Phan H.T.T., Moolhuijzen P.M., Bellgard M., Oliver R.P., Święcicki W., Wolko B.,**

- Cowling W.A.** 2008. A dense reference map of the *Lupinus angustifolius* L. genome: a foundation for building lupin genome research. Proc. of the 12th Int. Conf., Fremantle, Western Australia 14–18 September. 2008:255–258.
108. **Nelson M.N., Moolhuijzen P.M., Boersma J.G., Chudy M., Lesniewska K., Bellgard M., Oliver R.P., Swiecicki W., Wolko B., Cowling W.A., Ellwood S.R.**, 2010. Aligning a new reference genetic map of *Lupinus angustifolius* with the genome sequence of the model legume *Lotus japonicus*. DNA Research. 17:73–83.
109. **Nelson M.N., Phan H.T., Ellwood S.R.; Moolhuijzen P.M., Hane, J., Williams A., Clare E., Fosu-Nyarko J., Scobie M., Cakir, M.** 2006. The first gene-based map of *Lupinus angustifolius* L.-location of domestication genes and conserved synteny with *Medicago truncatula*. Theoretical and Applied Genetics. 113:225–238.
110. **Niszczota S., Dziubiński K., Kupidura A., Miziolek D., Pacuszka R., Raczkowska J., Rafa W.** 2019. Główny Urząd Statystyczny. Produkcja upraw rolniczych i ogrodniczych. Zakład Wydawnictw Statystycznych. Warszawa. 2019:56-57.
111. **Nitsch J. P., Nitsch C.** 1969. Haploid plants from pollen grains. Science. 163:85-87.
112. **Nowakowska A., Skrzypek E., Marcińska I., Czyczyło-Mysza I., Dziurka K., Juzoń K., Cyganek K., Warchoń M.** 2015. Application of chosen factors in the wide crossing method for the production of oat doubled haploids. Open Life Science. 10:112–118.
113. **Ochatt S., Pecha C., Grewalb R., Conreuxa C., Lulsdorfb M., Jacasa L.** 2009. Abiotic stress enhances androgenesis from isolated microspores of some legume species (*Fabaceae*). Journal of Plant Physiology. 166:1314-1328.
114. **Ochatt S.J., Sangwan R.S.** 2010 *In vitro* flowering and seed set: acceleration of generation cycles. In: Davey MR, Anthony P. (eds) Plant cell culture: essential methods. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester. 97–110.
115. **Orłowska R., Pachota K. A., Machczyńska J., Niedziela A., Zimny J., Bednarek P. T.** 2019. Zastosowanie metody Taguchiego do poprawy efektywności androgenozy w zbożowych kulturach *in vitro*. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin. 287:29–30.
116. **Ormerod A.J., Caligari P.D.S.** 1994. Embryoid production from *Lupinus albus* anther. Proceeding of VII International Lupin Conference. Advance in Lupin Research. 19-25.

117. **Panasiewicz K., Koziara W., Sulewska H., Faligowska A., Krawczyk R.** 2013. Wartość siewna i wigor nasion łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.) uprawianego w systemie konwencjonalnym i w okresie przestawiania na system ekologiczny. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*. 58(4):91-94.
118. **Pastuszewska B., Smulikowska S.** 2001. Nasiona łubinu jako pasza zastępująca mączki pochodzenia zwierzęcego w żywieniu świń i drobiu. *Zeszyty Nauk. Akademii Rolniczej we Wrocławiu*. 426:219-228.
119. **Pazos-Navarro M., Castello M., Bennett R. G., Nichols P., Croser J.** 2017. *In vitro*-assisted single-seed descent for breeding-cycle compression in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). *Crop & Pasture Science*. 68:958–966.
120. **Piekarczyk M.** 2007. Wartość przedplonowa łubinu wąskolistnego i jęczmienia jarego dla pszenicy ozimej w zależności od sposobu odchwaszczania łąnu. *Acta Scientiarum Polonorum Agricultura*. 6(3):59-67.
121. **Pluta M., Bartosiewicz J., Grynia J.** 2013. Metody uzyskiwania podwojonych haploidów oraz ich wykorzystanie w hodowli pszenicy. *Czasopismo Naukowo - Kulturalne, Episteme*. Kraków. (21):271-277.
122. **Plaża A., Gąsiorowska B., Makarewicz A.** 2014. Białko w mieszankach łubinu wąskolistnego z żytem jarym uprawianych na zieloną masę. *Fragmenta Agronomica*. 31(2):64–73.
123. **Plaża A., Górski R, Makarewicz A, Gąsiorowska B., Cybulska A.** 2017. Zawartość składników mineralnych w mieszankach łubinu wąskolistnego z żytem jarym uprawianych na zieloną masę. *Fragmenta Agronomica*. 34(3):88–96.
124. **Pniewski T., Kapusta J.** 2002. *In vitro* micropropagation of four lupin species. *Acta Physiologiae Plantarum*. 24(4):417-424.
125. **Podleśny J.** 2005. Rośliny strączkowe w Polsce- perspektywy uprawy wykorzystanie nasin. *Acta Agrophysica*. 6(1):213-224.
126. **Podleśny J., Podleśna A.** 2017. The after-effect of blue lupine mixtures with barley on yielding of winter wheat. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*. 62(4):95-98.
127. **Podleśny J., Podleśna A.** 2010. Wpływ temperatury w początkowym okresie wzrostu na plonowanie termo- i nietermoneutralnych odmian łubinu wąskolistnego. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*. Łubin- źródłem białka dla Europy. 97-104.

128. **Podleśny J., Podleśna A.** 2012. Wpływ wysokiej temperatury w okresie kwitnienia na wzrost, rozwój i plonowanie łubinu żółtego (Effect of high temperature during flowering on the growth, development and yield of yellow lupin). *Acta Agrophysica*. 19(4):825–834.
129. **Podleśny J., Podleśna A., Bieniaszewski T.** 2016. Występowanie chorób grzybowych na roślinach łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.) w różnych rejonach Polski. *Progress in Plant Protection*. 56(1):25-33.
130. **Podleśny J., Strobel W.** 2006. Wpływ terminu siewu na kształtowanie wielkości plonu nasion i białka zróżnicowanych genotypów łubinu wąskolistnego. *Acta Agrophysica*. 8(4):923-933.
131. **Podyma E., Turzyński D., Rybczyński J.J.** 1988. An immature embryo culture, vegetative propagation and somatic cell genetic manipulation of *Lupinus taxa*. in: Twardowski T. (ed.) Proceedings of the 5th international Lupin conference. 5–8 July 1988. Poznań, Poland. 439–443.
132. **Poznańska Hodowla Roślin.** 2018. Rośliny strączkowe. Groch siewny. Łubin wąskolistny. Łubin żółty. Katalog 2018. 13-20.
133. **Prusiński J.** 2015. Łubin biały (*Lupinus albus* L.) – historia udomowienia i postępu biologicznego. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 580:105–11.
134. **Prusiński J.** 2018. Odmiany roślin strączkowych w katalogu wspólnotowym Unii Europejskiej. *Fragmenta Agronomica*. 35(4):80–92.
135. **Prusiński J.** 2007. Postęp biologiczny w hodowli i uprawie grochu siewnego i bobiku. *Fragmenta agronomica XXIV*. 4(96):113-119.
136. **Prusiński J., Borowska M.** 2003. Potencjał biologiczny roślin strączkowych i jego wykorzystanie cz. II. Dolistne dokarmianie roślin strączkowych. *Hodowla Roślin i Nasiennictwo*. 1/2003:8- 13.
137. **Przyborowski J.A.** 2003. Pre- i postzygotyczne bariery przy krzyżowaniu wybranych gatunków z rodzaju *Lupinus*. *Rozprawy i Monografie. UWM Olsztyn*. 78–58.
138. **Przyborowski J.A., Packa D.** 1997. Embryo development after interspecific hybridisation of *Lupinus albus*, *L. mutabilis* Sweet and *L. angustifolius* L. *Journal of Applied Genetics*. 38(2):131-141.
139. **Przyborowski J.A., Wiwart M.** 1997. Wykorzystanie kultur *in vitro* izolowanych zarodków do indukcji mieszańców międzygatunkowych w rodzaju *Lupinus*. *Zeszyt Nauk Akademii Rolniczej im H. Kołłątaja w Krakowie*. 318:273-277.

140. **Rahim M.A., Caligari P.D.S.** 1996. Multiple shoot regeneration in *Lupinus mutabilis* Sweet. In: Abstract Book, VIII International Lupin Conference Looking toward the 21st Century, 11- 16 May 1996, Asilomar Conference Center, Pacific Grove, California, USA.
141. **Rizhsky L., Liang H., Mittler R.** 2002. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology*. 130:1143–1151.
142. **Rodrigues L.R., Marcelo S. Oliveira J., Mariath J.E.A., Iranco L.B., Bodanese-Zanettin M.H.** 2005. Anther culture and cold treatment of floral buds increased symmetrical and extra nuclei frequencies in soybean pollen grains. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 81:101–104.
143. **Romeo F.V., Fabroni S., Ballistreri G., Muccilli S. Spina A., Rapisarda P.** 2018. Characterization and Antimicrobial Activity of Alkaloid Extracts from Seeds of Different Genotypes of *Lupinus* spp. Licensee MDPI, *Sustainability* 1-12.
144. **Różewicz R.** 2019. Uprawa, wartość paszowa i efektywność stosowania nasion roślin bobowatych w mieszankach dla drobiu. *Wiadomości Zootechniczne*, R. LVII (2019). 2:78–91.
145. **Rutkowski A., Jankowski J.** 2011 – Białkowe bezpieczeństwo kraju, ze szczególnym uwzględnieniem żywienia zwierząt monogastrycznych w gospodarstwach agroturystycznych i tradycyjnych. *Przegląd Hodowlany*. 9:9-11.
146. **Rybczyński J.** 2001. Biotechnologia łubinów (przegląd literatury). *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu. Rolnictwo LXXXII*. 427:93-107
147. **Rybczyński J., Podyma E.** 1993. Micropropagation of some *Lupinus species* from seedling explants. Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences. 237-247.
148. **Rybiński W., Starzycki M., Rusinek R., Bocianowski J., Szot B.** 2013. Zmienność składu chemicznego nasion roślin strączkowych I ich odporność na obciążenie mechaniczne. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*. 268:193–209.
149. **Sator C.** 1985. Studies on shoot regeneration of lupins (*Lupinus spp.*). *Plant Cell Reports*. 4:126–128.
150. **Sawicka–Sienkiewicz E.** 1997. Hodowla łubinów w Polsce i na świecie. *Mat. Konf. Olsztyn– Kortowo, Łubin we Współczesnym Rolnictwie*. 37–58.

151. **Sawicka- Sienkiewicz E., Brejda E.,** 1999. Interspecific crossability of the Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet). Proc. of the 8th Int. Lupin Conf. Asilomar, California, USA, 11-16 May. 357-360.
152. **Sawicka–Sienkiewicz E., Galek R., Kalińska H., Zalewski D., Stawiński S.,** 2006. Proportion of pod wall and seed coat in mutants of cv Emir and in a collection of *Lupinus angustifolius*. Proc. 11th Int. Lupin Conf., Guadalajara, Mexico, 4–9 May 2005. 20–22.
153. **Schäefer – Menuhr A., Cherwinski T., Buschmann A.,** 1988. Der Einsatz von Embryokultur zur Gewinnung von Artberastarden aus der Kreuzung *Lupinus mutabilis* x *L. hartwegii*. Landbauforschung Völkenrode 38:173-177.
154. **Schenk R.U., Hildebrandt A.C.,** 1972. Canadian Journal Botany. (50):199-204.
155. **Sienkiewicz S., Wierzbowska J., Wojnowska T., Czapla J.** 2003. Gospodarka azotem oraz nagromadzenie białka i tłuszczu w nasionach trzech odmian łubinu wąskolistnego. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych. 495:407-413.
156. **Simioniuc D., Burlacu-Arsene M.C., Morariu A., Lipsa F.** 2010. Induction of the embryogenesis process in anther and microspores cultures at the *Lupinus albus* species. Lucrări Științifice. 53(1):60-63.
157. **Sipsas S.** 2008. Lupin products – concept and reality. Proceedings 12^t International Lupin Conference. 506–513.
158. **Siuba-Strzelińska M.** 2019. Świadomość konsumentów dotycząca zdrowego odżywiania. Przemysł spożywczy. Wydawnictwo SIGMA-NOT. Tom 73(12):31-33.
159. **Skowera B., Puła J.** 2004. Skrajne warunki pluwiotermiczne w okresie wiosennym na obszarze polski w latach 1971-2000. Acta Agrophysica. 3(1):171-177.
160. **Skrzypek E., Czyczyło-Mysza I., Marcinska I., Wędzony M.** 2008. Prospects of androgenetic induction in *Lupinus spp.* Plant Cell Tissue Organ Culture. 94:131–137
161. **Sobotka W., Stanek M., Bogusz J.** 2016. Evaluation of the nutritional value of yellow (*Lupinus luteus*) and blue lupine (*Lupinus angustifolius*) cultivars as protein sources in rats. Annals of Animal Science. 16(1):197–207.
162. **Sosnowska K.** 2011. Wykorzystanie krzyżowania oddalonego do poszerzania zmienności genetycznej w rodzaju *Brassica sp.* ROŚLINY OLEISTE– OILSEED CROPS. Tom XXXII. 211-222.

163. **Sroga G. E.** 1987. Plant regeneration of two *Lupinus* spp. from callus cultures via organogenesis. *Plant Science*. 51:245-249.
164. **Stawiński S.** 2016. Łubin wąskolistny – gatunek niewykorzystanych możliwości. *Rośliny strączkowe i motylkowate drobnonasienne*. 3:29-34.
165. **Stawiński S., Wróblewska R., Spychała K.** 1997. Charakterystyka niektórych cech termoneutralnej formy łubinu żółtego epigonalnego. *Zeszyty. Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*. 446:133-136.
166. **Surma M., Adamski T., Krystkowiak K., Kuczynska A., Mikołajczak K., Ogirodowicz P., Trzeciak R., Anioła A., Holewinska R.** 2015. Metody skracania cyklu hodowlanego grochu siewnego (*Pisum sativum* L.), łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.) i łubinu żółtego (*L. luteus* L.). Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. 1-24.
167. **Surma M., Adamski T., Kuczyńska A., Krystkowiak K., Trzeciak R., Mikołajczak K.** 2011. Zmodyfikowana technika pojedynczego ziarna w hodowli jęczmienia ozimego. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*. 262:59–66.
168. **Surma M., Adamski T., Święcicki W., Barzyk P., Kaczmarek Z., Kuczyńska A., Krystkowiak K., Mikołajczak K., Ogirodowicz P.** 2013. Preliminary results of in vitro culture of pea and lupin embryos for the reduction of generation cycles in single seed descent technique. Published by Polish Botanical Society. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 82(3):231–236.
169. **Szczepaniak A.** 2013. Badania naukowe realizujące założenie zrównoważonego rozwoju w agronomii. Zrównoważony rozwój- debiut nukowy. Rada Wydawnicza Państwowej Wyższej Szkoły Zawodowej w Raciborzu. 45-51.
170. **Szota M.** 1997. Nowe techniki uzyskania mieszańców oddalonych w rodzaju *Beta L.* *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin* 202:21-26.
171. **Ślusarkiewicz- Jarzina A., Wojciechowicz K., Pudelska H.** 2017. Poszukiwanie nowej zmienności genetycznej w obrębie rodzajów *Lupinus*, *Pisum* i *Vicia* – krzyżowanie oddalone i androgeneza. Symposium Naukowe „Zasoby genowe roślin użytkowych na rzecz hodowli”, Kazimierzu Dolnym, 6-8 września 2017.
172. **Święcicki W.** 2017. Współczesne cele hodowli łubinów. W: streszczenia, konferencja „Znaczenie łubinu dla bioróżnorodności”, 24–25 kwietnia 2017. Pawłowice– Wrocław. 11–13.

173. **Święcicki W., Rybczyński J.J., Święcicki W.K.** 2000. Domestication and genetics of the yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) and the biotechnological improvement of lupins. *Journal of Applied Genetics*. 41(1):11–34.
174. **Święcicki W., Święcicki W.K.** 1995. Domestication and breeding improvement of narrow-leaved lupin (*L. angustifolius* L.). *Journal of Applied Genetics*. 36(2):155–167.
175. **Święcicki W., Święcicki W.K., Wiatr K.** 1997. Historia, współczesne osiągnięcia i perspektywy hodowli roślin strączkowych w Polsce. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*. 446:15-32.
176. **Talhinhas P., Leitaõ J., Neves-Martins J.** 2006. Collection of *Lupinus angustifolius* L. germplasm and characterisation of morphological and molecular diversity *Genetic Resources and Crop Evolution*. 53:563–578.
177. **Turkec A.** 2005. Correlation and Path analysis of yield components in soybean varieties. *Turkish Journal of Field Crops*. 10:43-48.
178. **Upadhyaya A., Davis T., Sankhla D., Sankhla N.** 1992. Micropropagation of *Lupinus texensis* from Cotyledonary Node Explants. *Hortscience*. 27(11):1222-1223.
179. **Wang P., Chen Y.** 1983. Preliminary study on prediction of height of pollen H2 generation in winter wheat grown in the field. *Acta Agronomica Sinica*. 9:283-284.
180. **Warchoł M., Skrzypek E., Nowakowska A., Marcińska I., Czyczyło-Mysza I., Dziurka K., Juzoń K., Cyganek K.** 2016. The effect of auxin and genotype on the production of *Avena sativa* L. doubled haploid lines. *Plant Growth Regulator*. 78:155–165.
181. **Wiatr K., Dolata A., Mańczak T.** 2007. Koncentracja i zmienność podstawowych cech jakościowych nasion odmian łubinów zarejestrowanych w Polsce. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*. 522:75–85.
182. **Williams W., Akhtar M.A., Faluyi M.** 1980. Cross compatibility between European and American Lupin species. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 81:225- 232.
183. **Wilson J.G., Clements J.C., Quealy J., Yang H.** 2008. Development of an interspecific hybridisation protocol for *Lupinus*. *Proceedings 12th international lupin conference*. 147-151.

184. **Wink, M., Merino, F., & Käss, E.** 2000. Molecular evolution of *Lupinus* (*Leguminosae: Lupinus*): Proceedings of the 9th International Lupin Conference, Klink/Muritz, Germany, 20-24 June 1999. 278-286.
185. **Valente A., Talhinhos P., Roemer P., Olivier H., Neves- Martins J.** 2004. Evaluation of Resistance to Antracnose in lupin germplasm in: van Santen E., Hill G.G., eds Wild and cultivated lupins from the tropics to the Poles. Proc. of the 10th int. Lupin Conf. Laugarvatn, Iceland. 239-241.
186. **Vuillaume E., Hoff T.** 1986. Development *in vitro* d'embryons immatures de *Lupinus albus* L. et de *Lupinus mutabilis* Sweet par culture de gousses, d'ovules ou d'embryons isolés. Agronomie. 6:925–930.
187. **Yang H., Boersma J.G., You M., Buirchell B.J., Sweetingham M.W.** 2004. Development and implementation of a sequence specific PCR marker linked to a gene conferring resistance to anthracnose disease in narrow – leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.). Molecular Breeding. 14:145–151.
188. **Yang H., Renshaw D., Thomas G., Buirchell B., Sweetingham M.** 2008. A strategy to develop molecular markers applicable to a wide range of crosses for marker assisted selection in plant breeding: a case study on anthracnose disease resistance in lupin (*Lupinus angustifolius* L.). Molecular Breeding. 21(4):473–483.
189. **Yang H., Tao Y., Zheng Z., Zhang Q., Zhou G., Sweetingham M.W., Howieson J.G., Li C.** 2013. Draft genome sequence, and a sequence-defined genetic linkage map of the legume crop species *Lupinus angustifolius* L. PLoS one 2013. 8:e64799.
190. **You M., Boersma J.G., Buirchell B.J., Sweetingham M.W., Siddique K.H., Yang H.A.** 2005. A PCR-based molecular marker applicable for marker-assisted selection for anthracnose disease resistance in lupin breeding. Cell Molecular Biology. 10(1):123–134.
191. **Zalewski D., Galek R., Kozak B., Sawicka-Sienkiewicz E.** 2015. Phenomorphological and agronomic diversity in a collection of wild and domesticated species of the genus *Lupinus*. Turkish Journal of Field Crops. 20(1):43-48.
192. **Zalewski D., Galek R., Sawicki-Sienkiewicz E.** 2013. Wielocechowa statystyczna analiza kolekcji łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*). Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. 592:87-96.
193. **Zenktele M.** 2007. Kultura załączków, załączni i zarodków. W: Biotechnologia roślin. Red. S. Malepszy. PWN, Warszawa. 70-87.

194. **Zhou G., Jian J., Wang P., Li C., Tao Y., Li X., Renshaw D., Clements J., Sweetingham M., Yang M.** 2017. Construction of an ultra-high density consensus genetic map, and enhancement of the physical map from genome sequencing in *Lupinus angustifolius*. *Theoretical and Applied Genetics*. 131:209–223.
195. **Zielińska–Dawodziak M., Lampart-Szczapa E.** 2017. Czy łubin może stać się polską soją? *Przemysł spożywczy*. 1:39–41.
196. **Zimny J., Makowska K., Zimny A., Czaplicki A., Sowa S., Oleszczuk S.** 2019. Postęp w indukowaniu androgenezy i regeneracji roślin na przykładzie kultur *in vitro* mikrospor żyta. *Biuletyn. Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*. 285:33-34.
197. **Zoga M., Nowosad K., Galek R., Sawicak-Sienkiewicz E.** 2010. Zastosowanie markerów molekularnych w identyfikacji mieszańców *Lupinus albus lato L. X L. mutabilis* SWEET. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych. Łubin- źródłem białka dla Europy*. Warszawa 2010. 71-80.
198. **Żur I., Dubas E., Golemić E., Szechyn'ska-Hebda M., Janowiak F., Wędzony M.** 2008. Stress-induced changes important for effective androgenie induction in isolated microspore culture of triticale (*x Triticosecale Wittm.*). *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 94:319–328.

	liścienie		Kin 0,1 mg·dm ⁻¹ ABA, 0,25 mg·dm ⁻¹ BAP albo Zeat 1 mg·dm ⁻¹ GA ₃	somatycznej i regeneracja roślin	
<i>L. texensis</i>	hipokotyl	MS	4,4 μM BA lub 4,5 μM KIN, 27 μM NAA	Tworzenie się pędów Wykształcenie się korzeniu po dodaniu NAA	Upodhyaya i in. 1992 r.
<i>L. luteus</i>	hipokotyl	MS	10 μM 2iP, 0,11 μM NAA 0,05 μM 2iP, 0,5 μM NAA	Indukcja pąków i pędów przybyszowych i ich ukorzenie, regeneracja roślin	Daza i Chanber 1993 r.
<i>L. albus</i> <i>L. luteus</i> , <i>L. angustifolius</i> , <i>L. hispanicum</i> , <i>L. polyphyllus</i>	5 lub 14 dniowe eksplantaty w postaci siewek	Zmodyfikowane podłoże B5		Wielopędowe sadzonki	Rybczyński i Podym 1993 r.
<i>L. mutabilis</i>	nasiona	MS	50 μM BAP lub 50 μM TDZ, 16 μM NAA	Indukcja w kulturach <i>in vitro</i> , ukorzenie w 63 % po dodaniu NAA	Hardy i in. 1995 r.
<i>L. mutabilis</i>	siewki	MS	TDZ	Wykształcenie korzeni u nielicznych eksplantatów	Rahim i Caligari 1996 r.
<i>L. albus</i> <i>L. luteus</i>	nasiona	½MS makroelementy	0,2 mg·dm ⁻¹ i 1 mg·dm ⁻¹ IAA, 0,3 mg·dm ⁻¹ IBA,	Wielopędowe sadzonki	Pniewski i in. 2002 r.

<i>L. angustifolius</i> <i>L. mutabilis</i>		+MS mikroelementy Witaminy B5	0,1 mg·dm ⁻¹ NAA		
<i>L. mutabilis</i>	osie zarodkowe	B5	3 mg·dm ⁻¹ BA 3 mg·dm ⁻¹ 2iP 3 mg·dm ⁻¹ BA + 0,2 mg·dm ⁻¹ NAA 3 mg·dm ⁻¹ 2iP+ 0,2 mg·dm ⁻¹ IAA	Pełna regeneracja roślin Regeneracja w pędy, liście i korzenie	Galek i in. 2009
<i>L. termis</i> <i>L. mutabilis</i>	merystemy	B5	1,5 mg·dm ⁻¹ BA, 1,0 mg·dm ⁻¹ NAA, 0,3 mg·dm ⁻¹ IBA 1,5 mg·dm ⁻¹ BA + 1 mg·dm ⁻¹ NAA 1,5 mg·dm ⁻¹ BA + 3 mg·dm ⁻¹ IBA	Pełna morfogeneza u <i>L. termis</i> i <i>L. mutabilis</i>	Galek i in. 2010 r.
<i>L. termis</i>	nasiona	MS	Ekstrakt drożdżowy : 0, 50,100 i 150 mg·dm ⁻¹	Dążenie do uzyskania kalusa	Hamza 2013 r
<i>L. albus</i>	5 dniowe siewki	M519 ½ M519 ⅓ M519 ¼ M519	4,0 mg·dm ⁻¹ Kin + 0,1 mg·dm ⁻¹ NAA 4,0 mg·dm ⁻¹ Kin + 0,1 mg·dm ⁻¹ NAA + 1,67 mg·dm ⁻¹ BAP 2,0 mg·dm ⁻¹ Kin + 0,1 mg·dm ⁻¹ NAA	Tworzenie się nowych pędów	Aslam i in. 2020 r.

Tabela 2. Zestawienie badań prowadzonych w rodzaju *Lupinus* dla uzyskania roślin haploidalnych na drodze androgenezy

Gatunek	Rodzaj eksplantatu	Pożywka i kombinacja regulatorów	Szok termiczny/fizyczny	Osiągnięty rezultat	Literatura
<i>L. polyphyllus</i>	pylniki	<ul style="list-style-type: none"> MS + 1 mg·dm⁻¹ 2,4 D + 1 mg·dm⁻¹ BAP + 0,1 mg·dm⁻¹ IAA MS + 1,5 mg·dm⁻¹ + 0,2 mg·dm⁻¹ NAA MS + 2 mg·dm⁻¹ BAP + 0,2 mg·dm⁻¹ NAA 		Kalus z zregenerowanych pylników	Sator 1985r.
<i>L. albus</i>	pylniki i mikrospory	<ul style="list-style-type: none"> N&N + B5 Witaminy + 1 mg·dm⁻¹ NAA + 0,5 mg·dm⁻¹ 2,4 D + 1 mg·dm⁻¹ Kin + 0,5 mg·dm⁻¹ BAP + 5% sacharozy lub maltozy + 0,8 g·dm⁻¹ L- proline + 0,1 mg·dm⁻¹ L – seryna S&H + 0,09 mg·dm⁻¹ GA₃ + 5% sacharozy lub maltozy + 8% agaru 	Pąki chłodzono w temp. 4°C w ciemnym miejscu	Zarodki somatyczne powstałe z dwujądrowych mikrospor	Ormerod and Caligari 1994 r.
<i>L. albus</i> , <i>L. angustifolius</i> , <i>L. luteus</i>	mikrospory	<ul style="list-style-type: none"> Zmodyfikowane pożywki: N&N (makroelementy) + B5 (mikroelementy) KM + 0,3 M manitolu + 166 mg·dm⁻¹ CaCl₂ 2H₂O + 40 mg·dm⁻¹ FeEDTA KM + 0,3 M manitolu + 166 mg·dm⁻¹ CaCl₂ 2H₂O + 40 mg·dm⁻¹ FeEDTA + 2% sacharozy 0,4 % PEG + 2% mleka kokosowego + 250- 500 mg·dm⁻¹ hydrolizat elcysteiny 	Indukcja mikrospor przez 24 h w 4°C oraz 32 °C	Uzyskanie struktur wielokomórkowe	Bayliss i in. 2004 r.
<i>L. albus</i> , <i>L. angustifolius</i> , <i>L. luteus</i>	pylniki	<ul style="list-style-type: none"> N&N makro- + B5 mikro-elementy (płynna) MS + 1 mg·dm⁻¹ NAA / +1mg·dm⁻¹ BA SH +1 mg·dm⁻¹ NAA / +1 mg·dm⁻¹ BA B5+ 1 mg·dm⁻¹ NAA / +1 mg·dm⁻¹ BA 	Pąki chłodzono w temp. 4°C w ciemnym miejscu	Uzyskanie struktur wielokomórkowych a następnie kalus	Skrzypek 2008 r.

		<ul style="list-style-type: none"> • NNB5 + 1 mg·dm⁻¹ NAA / +1 mg·dm⁻¹ BA 	(2-5 dni) lub 32 °C (1-3 dni)		
<i>L. ablus</i>	Pylniki i mikrospory	<ul style="list-style-type: none"> • MS + 2,4 D (0,1 mg·dm⁻¹, 0,5 mg·dm⁻¹, 1 mg·dm⁻¹) 	Brak	Uzyskanie struktur podobnych do zarodków	Simioniuc i in. 2010
<i>L. angustifolius</i>	pylniki	<ul style="list-style-type: none"> • MS + 2 mg·dm⁻¹ 2,4 D+ 0,5 mg·dm⁻¹ Kin • MS + 2 mg·dm⁻¹ BA + 0,5 mg·dm⁻¹ NAA 	Termiczne traktowanie pąków w 4 °C w ciemności	Uzyskanie struktur wielokomórkowych	Kozak i in. 2012
<i>L. angustifolius</i>	pylniki	<ul style="list-style-type: none"> • NLL • MS 	Termiczne traktowanie pąków w 4 °C w ciemności	Uzyskanie struktur wielokomórkowych	Galek i in. 2019

Tabela 3. Charakterystyka 108 linii RILs pod względem pokroju rośliny, koloru kwiatów oraz barwy nasion

Obiekt	Kolor kwiatu	Pokrój rośliny	Barwa nasion
201	biały	Epigonalny	biały
203	biały	Epigonalny	biały
204	biały	Tradycyjny	biały
205	biały	Tradycyjny	biały
206	biały	Epigonalny	biały
207	biały	Epigonalny	biały
208	biały	Tradycyjny	biały
209	biały	Epigonalny	biały
210	biały	Tradycyjny	biały
211	biały	Epigonalny	biały
213	różowy	Tradycyjny	szary marmurek
215	niebieski	Epigonalny	szary marmurek
216	różowy	Epigonalny	szary marmurek
218	różowy	Tradycyjny	szary marmurek
219	biały	Tradycyjny	biały
220	różowy	tradycyjny	szary marmurek
221	biały	tradycyjny	biały
222	biały	tradycyjny	biały
224	niebieski	tradycyjny	szary marmurek
225	różowy	tradycyjny	szary marmurek
228	biały	tradycyjny	biały
229	biały	tradycyjny	biały
230	biały	tradycyjny	biały
232	biały	tradycyjny	biały
234	biały	tradycyjny	biały
237	biały	tradycyjny	biały
238	biały	tradycyjny	biały
239	biały	tradycyjny	biały
240	biały	epigonalny	biały
241	biały	tradycyjny	biały
242	różowy	tradycyjny	szary marmurek
244	biały	tradycyjny	biały

245	biały	epigonalny	biały
246	biały	epigonalny	biały
247	różowy	epigonalny	szary marmurek
248	różowy	tradycyjny	szary marmurek
249	różowy	tradycyjny	szary marmurek
252	niebieski	tradycyjny	biały
253	niebieski	epigonalny	szary marmurek
255	różowy	tradycyjny	biały
257	biały	epigonalny	biały
258	biały	epigonalny	biały
260	różowy	epigonalny	szary marmurek
261	niebieski	epigonalny	szary marmurek
262	niebieski	epigonalny	szary marmurek
263	różowy	tradycyjny	szary marmurek
264	różowy	tradycyjny	szary marmurek
265	różowy	epigonalny	szary marmurek
266	różowy	epigonalny	szary marmurek
267	różowy	tradycyjny	szary marmurek
268	różowy	epigonalny	szary marmurek
269	różowy	tradycyjny	szary marmurek
270	różowy	tradycyjny	szary marmurek
271	różowy	tradycyjny	szary marmurek
272	biały	epigonalny	biały
273	niebieski	epigonalny	szary marmurek
275	różowy	tradycyjny	szary marmurek
276	różowy	epigonalny	szary marmurek
277	różowy	tradycyjny	szary marmurek
278	biały	epigonalny	biały
279	niebieski	epigonalny	biały
280	niebieski	tradycyjny	szary marmurek
281	niebieski	tradycyjny	szary marmurek
282	biały	tradycyjny	biały
283	biały	epigonalny	biały
284	biały	tradycyjny	biały
285	różowy	epigonalny	szary marmurek

286	różowy	tradycyjny	szary marmurek
287	różowy	tradycyjny	szary marmurek
288	biały	tradycyjny	biały
289	różowy	tradycyjny	biały
291	różowy	tradycyjny	szary marmurek
292	biały	tradycyjny	szary marmurek
293	różowy	epigonalny	szary marmurek
296	różowy	epigonalny	szary marmurek
298	biały	tradycyjny	biały
299	biały	epigonalny	biały
300	biały	epigonalny	biały
301	biały	tradycyjny	biały
306	biały	epigonalny	szary marmurek
308	biały	tradycyjny	biały
309	biały	epigonalny	biały
310	biały	epigonalny	biały
311	biały	epigonalny	biały
312	biały	epigonalny	biały
313	biały	epigonalny	biały
314	biały	epigonalny	biały
315	biały	epigonalny	biały
316	biały	epigonalny	biały
317	różowy	epigonalny	szary marmurek
318	biały	epigonalny	biały
319	różowy	epigonalny	szary marmurek
320	różowy	epigonalny	szary marmurek
321	różowy	epigonalny	szary marmurek
322	różowy	epigonalny	szary marmurek
323	biały	epigonalny	biały
324	różowy	epigonalny	szary marmurek
325	biały/ różowy	epigonalny	biały
326	biały/ różowy	epigonalny	biały
327	różowy	epigonalny	biały
328	biały	epigonalny	biały
329	różowy	epigonalny	szary marmurek

330	różowy	epigonalny	szary marmurek
331	biały/ różowy	epigonalny	biały
332	biały/ różowy	epigonalny	biały
333	biały/ różowy	epigonalny	biały
EMIR	różowy	tradycyjny	szary marmurek
Lae-1	biały	epigonalny	biały

Tabela 4a Dane meteorologiczne ze Stacji Hodowli Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, Oddział Przebędowo – 2016-2018 oraz z wielolecia

Miesiąc	Średnia temperatura (°C)	Suma opadów w (mm)	Współczynnik hydrotermiczny wg. Sielanianowa
2016			
Kwiecień	4,2	44,7	3,5
Maj	6,7	44,6	2,1
Czerwiec	13,9	66,5	1,6
Lipiec	18,6	89,1	1,5
Sierpień	19,1	157,3	2,7
Wrzesień	17,9	38,6	0,7
2017			
Kwiecień	6,7	45,3	2,3
Maj	7,6	61,7	2,6
Czerwiec	13,9	65,7	1,6
Lipiec	17,6	108,2	2,0
Sierpień	18,1	217,1	3,9
Wrzesień	18,9	143,3	2,5
2018			
Kwiecień	1,2	41,7	11,6
Maj	13,2	41,7	1,0
Czerwiec	17,6	8,8	0,2
Lipiec	19	58	1,0
Sierpień	20,8	92,8	1,4
Wrzesień	21,4	19,8	0,3
1981-2015			
Kwiecień	3,6	45,4	4,2
Maj	8,9	32,3	1,2
Czerwiec	14	56	1,3
Lipiec	16,9	66,9	1,3
Sierpień	18,9	95,4	1,6
Wrzesień	18,2	67,3	1,2

Tabela 4b. Dane metrologiczne ze Rolniczego Zakładu Doświadczalnego Swojec Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu- 2016-2018 oraz z wielolecia

Miesiąc	Średnia temperatura (°C)	Suma opadów w (mm)	Współczynnik hydrotermiczny wg. Sielianinowa
2016			
Kwiecień	8,7	46,4	1,7
Maj	15,3	5,3	0,1
Czerwiec	18,6	44,6	0,9
Lipiec	19,5	114,3	1,9
Sierpień	17,9	27,1	0,8
2017			
kwiecień	7,9	57	2,4
maj	14,2	24,1	0,5
czerwiec	18,5	52,5	0,9
lipiec	19	112,2	1,9
sierpień	19,4	43,6	0,7
2018			
kwiecień	13,7	19	0,5
maj	17,1	54,3	1,0
czerwiec	18,8	36,6	0,6
lipiec	20,1	79,1	1,3
sierpień	21,1	20,3	0,3
1981-2015			
kwiecień	8,9	33,6	1,3
maj	14,4	54,1	1,2
czerwiec	17,3	67,4	1,3
lipiec	19,6	78	1,3
sierpień	18,6	65,3	1,1

Tabela 5. Schemat przepylenia czterech genotypów *L. angustifolius* x *L. luteus*

Lp.	Genotyp	Donor pyłku	Czas zbioru słupków	Ilość przepylonych kwiatów	Ilość zebranych słupków	Efektywność zawiązywania strąków
				szt.	szt.	%
1	Graf	<i>L. luteus</i> 500	48 h	14	12	85,7
			96 h	11	10	90,9
			168 h	11	10	90,9
2	Graf	<i>L. luteus</i> 501	48 h	18	13	72,2
			96 h	16	14	87,5
			168 h	10	10	100,0
3	Graf	<i>L. luteus</i> <i>Przebędowo</i>	48 h	11	10	90,9
			96 h	15	11	73,3
			168 h	18	10	55,6
4	Emir	<i>L. luteus</i> 500	48 h	15	15	100,0
			96 h	11	10	90,9
			168 h	14	10	71,4
5	Emir	<i>L. luteus</i> 501	48 h	13	11	84,6
			96 h	16	10	62,5
			168 h	19	10	52,6
6	Emir	<i>L. luteus</i> <i>Przebędowo</i>	48 h	11	10	90,9
			96 h	10	10	100,0
			168 h	14	10	71,4
7	Lae-1	<i>L. luteus</i> 500	48 h	12	10	83,3
			96 h	11	11	100,0
			168 h	13	10	76,9
8	Lae-1	<i>L. luteus</i> 501	48 h	10	10	100,0
			96 h	12	10	83,3
			168 h	14	9	64,3
9	Lae-1	<i>L. luteus</i> <i>Przebędowo</i>	48 h	12	10	83,3
			96 h	13	10	76,9
			168 h	11	10	90,9
10	Karo	<i>L. luteus</i> 500	48 h	15	10	66,7

			96 h	16	11	68,8
			168 h	11	10	90,9
11	Karo	<i>L. luteus 501</i>	48 h	16	10	62,5
			96 h	15	10	66,7
			168 h	15	10	66,7
12	Karo	<i>L. luteus Przebędowo</i>	48 h	12	12	100,0
			96 h	11	10	90,9
			168 h	11	10	90,9

Tabela 6. Skład pożywki ML6 wg Kumar i in. (1988), NLN wg Nitsch i Nitsch (1969) oraz B5 wg Gamborga (1986)

	ML6	NLN	B5
Makroelementy	mg·dm ⁻¹	mg·dm ⁻¹	mg·dm ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1000	-	-
KNO ₃	1000	500	2500
CaCl ₂ ·2H ₂ O	330	-	150
MgSO ₄ ·7H ₂ O	179	61	250
KH ₂ PO ₄	170	125	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	134
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	-	-	150
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	500	-	-
Mikroelementy			
KI	0,83	-	0,75
H ₃ BO ₃	6,2	10	3
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22	18,95	10
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	10	2
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	0,25
Na ₂ ·EDTA	-	-	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	-
NaFeEDTA	27,85	36,7	37,3
Witaminy			
Mezoinozytol	100	100	100
Kw. Nikotynowy	1	5	1
Pirydoksyna	1	0,5	1
Tianina	10	0,5	10
kw. Foliowy	-	0,5	-
Biotyna	-	0,05	-
Zw. Organiczne	-	-	-
Glicyna	-	2	-
Glutamina	-	800	-
Glutation	-	30	-
L- Seryna	-	100	-

Hydrolizat kazeiny	200	-	-
	g ^l ⁻¹	g ^l ⁻¹	g ^l ⁻¹
Sacharoza	90	130	20
Sorbitol	10	-	-
Agar	8	8	8

Tabela 7. Indukcja androgenezy w kulturach izolowanych mikrospor czterech genotypów łąbinu wąskolistnego - schemat doświadczenia laboratoryjnego

	Kultura izolowanych mikrospor
Genotyp	'Emir', 'Graf', 'Karo', Lae-1.
Ocena stadium	Stadium 1 lub 2 jądrowe
Traktowanie wstępne	<ul style="list-style-type: none"> • Pąki chłodzone przez 7 dni w 4 °C • Pąki bez chłodzenia
Odkazanie materiału	<ul style="list-style-type: none"> • Detergent 15 min + alkohol 70% • 0,1 % sublimat 10 min • 3 x płukanie – 5', 10' i 15'
Pożywki	<ul style="list-style-type: none"> • B5 • B5 + 0,5 mg·dm⁻¹ BA
Obserwacje	<ul style="list-style-type: none"> • Obserwacja rozwoju mikrospor • Określenie liczebności struktur mikrosporowych

Tabela 8. Procedura wykonania preparatów trwałych *L. angustifolius* L. wg. Filutowicz i Kuźdowicz (1951)

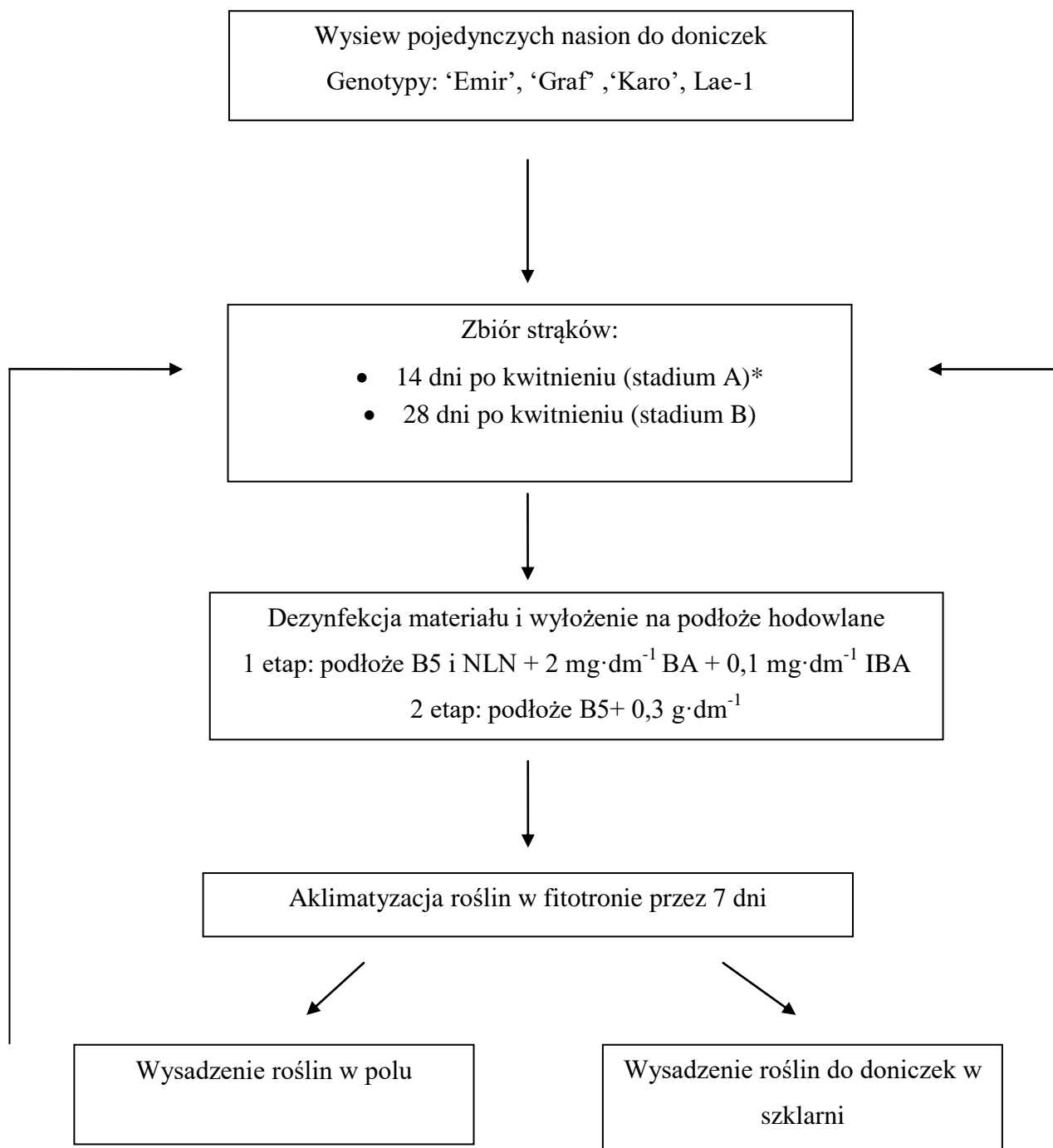
I ETAP	II ETAP	III ETAP
Odwadnianie i zatapianie materiału roślinnego	Parafinowanie	Barwienie preparatów
Woda destylowana	Zarodki zanurzone w alkoholu	Ksylen I
Woda destylowana	butylowym umieszczany w	Ksylen II
Woda destylowana	termostacie 60	Ksylen III
Alkohol etylowy 10%	Alkohol butylowy + parafina 20%	Alkohol etylowy I
Alkohol etylowy 20%		Alkohol etylowy II
Alkohol etylowy 30%	Alkohol butylowy + parafina 40%	Alkohol etylowy III
Alkohol etylowy 40%		Alkohol etylowy 80 % Alkohol etylowy 60 %
Alkohol etylowy 50% + etylowy + butylowy+ woda	Alkohol butylowy + parafina 60%	Alkohol etylowy 40 % Alkohol etylowy 20 %
Alkohol etylowy 70% + etylowy + butylowy+ woda	Alkohol butylowy + parafina 80%	Wda destylowana
Odpowietrzanie i pozostawienie na 24 h	Parafina I	HCL – zimny HCL 60°C HCL- zimny
Alkohol 85% + etylowy + butylowy+ woda	Parafina II	Woda detylowana
Alkohol 95% + etylowy + butylowy+ woda	Parafina III	Bufor o pH 2,6
Alkohol 100% + etylowy + butylowy	R-r ze słupkami łubinu wylano do specjalnie przygotowanych	Alkohol etylowy 20% Alkohol etylowy 40 %
Alkohol butylowy I	foremek	Alkohol etylowy 60 % Alkohol etylowy 80 %
Alkohol butylowy II	Po zastygnięciu zatopiony we	Błękit astra
Alkohol butylowy III	wosku słupek cięto za pomocą	Izopropanol I, II, III
Materiał roślinny pozostawiono na 24 h	mikrotonu i umieszczano na szkiełkach podstawowych	Ksylen I, II, III Preparaty zamknięto w balsamie kanadyjskim

Tabel 9. Schemat doświadczenia- krzyżowanie oddalone czterech genotypów *Lupinus angustifolius* z trzema liniami induktorów *L. luteus*

	Krzyżowanie 4 genotypów lubinu wąskolistnego
Genotyp	'Emir', 'Karo', Lae-1 , 'Graf'.
Przepylacz	<i>L. luteus</i> : 500, 501, Przebędowo
Traktowanie wstępne	Po 2 dniach od przepylecia traktowanie roślin auksyną: 2,4 D (stężenie 100 mg/ml)
Czas pobrania słupków	<ul style="list-style-type: none"> • 48 h • 96 h • 168 h
Odkazanie materiału	Materiał pobrany z pola <ul style="list-style-type: none"> • Detergent 15 min + alkohol 70% • 0,1 % sublimat - 10 min • 3x płukanie w sterylnej wodzie – 5,10,15 min. • Javel 1: 3 - 7 min • 3 x płukanie w sterylnej wodzie – 5,10 i 15 min (do ostatniego płukania dodano 3 krople citroseptu)
	Materiał pobrany ze szklarni <ul style="list-style-type: none"> • Javel 1: 3- 7 min • 3 x płukanie w sterylnej wodzie – 5,10 i 15 min (do ostatniego płukania dodano 3 krople citroseptu)
Pożywki	<ul style="list-style-type: none"> • B5 + 0,3 g·dm⁻¹ AC + 0,2 mg·dm⁻¹ BA (sacharoza 30 g·dm⁻¹) • NLN + 0,1 mg·dm⁻¹ NAA (sacharoza 130 g·dm⁻¹) • ML6 + 0,1 mg·dm⁻¹ NAA (sacharoza 90 g·dm⁻¹ + 10 g·dm⁻¹ sorbitolu) Po 7 i 21 dniach: <ul style="list-style-type: none"> • NLN + 0,1 mg·dm⁻¹ NAA + AC • ML6 + 0,1 mg·dm⁻¹ NAA + AC • B5 + AC
Obserwacje	<ul style="list-style-type: none"> • Obserwacje i pomiary załączków po: 7, 14*, 21 i 28 dniach

* Po 14 dniach – powrót do pożywki wyjściowej

Tabela 10. Schemat możliwości uzyskania kilku pokoleń łubinu wąskolistnego w oparciu o metodę pojedynczych nasion (SSD)



*- z uwagi na złą regenerację osi zarodkowych zrezygnowano z tego stadium w następnym pokoleniu.

Tabela 11. Współczynniki korelacji dla analizowanych cech morfologicznych i plonu łąbinu wąskolistnego

Cecha		Wysokość pędu	Wysokość całej rośliny	Długość kwiatostanu pędu głównego	Liczba okółków na pędzie głównym/ liczba kwiatów	Liczba zawiązanych strąków na pędzie głównym	Plon z poletka (kg)	MTN [g]
		I	II	III	VI	VII	X	XI
Wysokość pędu	I							
Wysokość całej rośliny	II	0,88*						
Długość kwiatostanu pędu głównego	III	0,59	0,29					
Liczba okółków na pędzie głównym/ liczba kwiatów	VI	0,49	0,17	0,74*				
Liczba zawiązanych strąków na pędzie głównym	VII	0,28	0,03	0,74*	0,56			
Plon z poletka (kg)	X	0,38	0,39	0,27	0,07	0,25		
MTN [g]	XI	0,37	0,55	-0,16	-0,24	-0,23	0,36	

*- istotność na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 12. Odziaływanie środowiska na poszczególne cechy morfologiczne i plon 108 linii RILs

Odziedziczalność	Wysokość pędu	Wysokość całej rośliny	Długość kwiatostanu pędu głównego	Liczba rozgałęzień Produktywnych I rz.	Liczba okółków na pędzie głównym/ liczba kwiatów	Liczba zawiązanych strąków na pędzie głównym	Plon z poletka [kg]	MTN[g]
w szerokim sensie	I	II	III	V	VI	VII	VIII	IX
	0,28	0,18	0,30	0,02	0,05	0,05	0,08	0,04
średnich	0,64	0,47	0,64	0,14	0,19	0,20	0,31	0,30

Tabela 13. Zestawienie średnich wartości cech morfologicznych dla 108 lini RILs łubinu w latach 2016 – 2018

Obiekt	Wysokość pedu głównego		Wysokość całej rośliny		Długość kwiatostanu pedu głównego		Długość kwiatostanu pedu bocznego		Liczba rozgałęzień Produktywnych I rz.		Liczba okółków na pędzie głównym		Liczba zawiązanych strąków na pędzie głównym		Liczba okółków na pędzie bocznym		Liczba zawiązanych strąków na pędzie bocznym	
	średnia	V%	średnia	V%	średnia	V%	średnia	V%	średnia	V%	średnia	V%	średnia	V%	średnia	V%	średnia	V%
201	54,5	24,5	54,5	24,5	27,1	17,9	-	-	-	-	12,1	28,7	6,7	42,2	-	-	-	-
203	58,0	13,4	58,5	12,5	29,2	28,5	-	-	-	-	8,7	40,4	8,0	49,8	-	-	-	-
204	48,3	13,1	53,4	17,1	14,0	45,9	4,3	62,2	2,5	34,8	7,5	16,3	4,9	33,9	2,0	44,9	2,5	48,5
205	58,0	14,4	68,1	25,5	20,4	29,0	8,7	50,8	4,1	57,6	9,3	38,0	5,3	39,7	4,9	54,9	3,6	36,2
206	54,8	20,0	54,8	20,0	25,1	18,0	-	-	-	-	13,2	18,9	7,1	33,1	-	-	-	-
207	54,3	18,0	54,3	18,0	23,8	16,9	-	-	-	-	11,2	15,3	7,7	30,7	-	-	-	-
208	47,0	10,5	55,9	18,0	16,7	28,9	6,2	50,0	2,6	26,2	7,9	17,0	4,6	48,1	2,1	39,7	2,9	40,5
209	46,2	18,5	46,2	18,5	26,1	12,2	-	-	-	-	9,3	19,0	7,6	33,2	-	-	-	-
210	44,0	13,3	50,7	18,9	14,7	43,6	5,1	59,7	2,7	24,4	7,5	17,2	3,8	43,6	2,6	38,6	2,8	36,0
211	62,0	11,9	62,0	11,9	30,6	25,8	-	-	-	-	11,1	24,5	7,4	43,2	-	-	-	-
213	53,9	8,2	61,8	17,6	17,0	34,1	5,2	36,9	2,8	32,2	9,0	16,0	5,1	46,3	2,2	51,3	2,5	20,7
215	61,6	12,8	61,6	12,8	26,3	10,9	-	-	-	-	11,6	15,2	6,6	38,5	-	-	-	-
216	64,6	17,1	64,6	17,1	28,0	18,3	-	-	-	-	14,3	19,6	7,7	44,8	-	-	-	-
218	56,5	7,8	61,3	11,8	16,8	21,0	5,4	40,2	3,3	26,2	8,4	31,1	5,5	26,8	2,2	39,0	2,8	33,9
219	59,9	12,2	65,2	21,4	21,6	26,0	6,8	55,3	2,7	40,0	7,7	35,8	4,9	38,4	2,9	71,3	2,8	49,6
220	53,0	15,2	57,3	18,3	17,3	35,6	4,5	63,2	2,6	39,2	9,3	25,6	5,8	30,0	2,0	42,2	2,8	36,4
221	61,9	13,9	68,8	17,4	20,5	28,1	5,1	51,0	2,4	35,8	8,1	21,7	5,8	31,4	1,9	39,1	2,5	43,7
222	60,2	19,0	67,0	20,5	20,2	27,6	7,4	126,3	2,4	297,0	8,8	43,3	5,0	109,5	3,1	239,8	2,9	36,1
224	58,7	6,2	64,7	8,6	19,3	23,8	4,7	49,3	4,0	53,2	10,0	21,6	7,0	34,9	2,7	28,8	3,4	44,7
225	56,6	10,9	59,3	9,6	19,2	24,3	6,8	53,7	4,5	54,7	9,1	24,1	6,1	42,1	2,9	34,7	4,0	38,7

228	59,8	11,6	75,1	21,9	19,2	16,6	5,9	30,0	2,9	45,0	7,3	39,3	5,0	42,3	2,2	35,8	2,7	17,8
229	64,4	10,2	72,3	13,0	21,5	21,9	7,9	42,1	3,2	52,6	9,8	24,1	6,0	36,2	3,1	51,0	3,4	34,8
230	65,0	10,2	73,2	11,0	19,4	27,0	5,6	27,1	2,3	38,6	7,9	27,6	5,2	24,7	2,1	45,4	2,1	39,1
232	64,1	10,6	72,0	14,2	19,0	21,0	5,8	58,5	3,0	50,3	10,3	17,4	5,7	39,3	3,2	40,2	3,9	43,6
234	58,6	11,8	69,4	10,1	18,0	20,5	3,5	49,2	2,4	24,5	6,9	33,9	4,1	58,7	2,1	41,5	2,3	31,8
237	48,4	6,7	51,3	13,9	14,3	25,6	4,8	36,6	2,1	38,0	8,0	32,0	5,3	39,8	2,4	50,2	2,8	36,2
238	50,5	7,8	55,4	13,5	16,3	27,4	4,3	39,7	2,5	30,4	8,6	26,1	6,5	18,5	3,0	28,4	2,9	38,2
239	53,5	11,9	63,4	17,7	19,9	20,6	7,8	48,6	3,3	24,8	10,4	17,9	5,8	33,3	4,5	18,9	2,9	25,8
240	61,2	7,8	61,2	7,8	30,4	32,1	-	-	-	-	10,3	24,7	7,0	45,3	-	-	-	-
241	64,8	11,2	72,9	12,2	20,3	22,5	5,4	47,4	2,8	53,3	8,9	31,4	5,8	36,4	2,5	47,2	3,0	44,3
242	60,8	9,3	66,1	12,8	18,2	24,6	4,6	53,0	2,8	62,6	8,0	25,5	4,4	44,5	1,6	31,6	2,9	54,7
244	52,1	7,6	56,3	14,7	15,1	31,1	3,8	38,7	2,3	34,1	7,5	26,8	5,4	30,3	2,3	50,2	3,2	50,8
245	70,3	10,7	70,3	10,7	30,7	28,2	-	-	-	-	11,5	21,3	7,1	56,2	-	-	-	-
246	67,4	10,9	67,4	10,9	33,8	37,5	-	-	-	-	10,5	21,3	6,3	38,7	-	-	-	-
247	52,3	9,6	53,3	11,0	19,4	31,4	5,4	55,3	3,4	59,9	8,5	41,1	3,7	53,6	2,1	48,4	2,3	32,9
248	51,0	10,7	55,4	16,6	13,8	45,9	4,1	68,0	2,8	20,0	7,3	64,5	3,8	49,3	1,9	36,2	1,9	46,2
249	56,5	9,2	60,0	13,3	15,8	31,2	4,4	68,1	2,2	27,0	8,0	42,4	4,4	38,6	1,8	42,1	2,3	35,2
252	58,0	6,5	62,1	7,7	17,0	23,6	6,2	80,4	2,5	29,0	10,1	35,1	5,2	42,6	2,2	34,3	3,0	33,3
253	65,7	10,5	65,7	10,5	24,1	11,7	-	-	-	-	9,0	20,5	6,3	50,7	-	-	-	-
255	49,0	18,6	49,0	18,6	15,9	52,9	-	-	-	11,9	6,5	3,6	1,1	-	-	-	-	-
257	60,9	14,8	60,9	14,8	33,1	25,2	-	-	-	-	11,9	23,2	7,8	36,3	-	-	-	-
258	60,2	23,8	60,2	23,8	30,7	36,3	-	-	-	-	11,0	23,7	7,1	48,5	-	-	-	-
260	64,9	16,0	64,9	16,0	25,3	20,5	-	-	-	-	11,0	13,0	7,2	28,6	-	-	-	-
261	64,5	14,1	64,5	14,1	25,8	21,7	-	-	-	-	11,0	21,4	5,8	38,5	-	-	-	-
262	66,1	13,3	66,1	13,3	27,8	11,8	-	-	-	-	10,3	45,8	7,5	36,5	-	-	-	-
263	54,2	12,8	59,3	19,4	15,5	20,6	5,5	46,8	1,8	50,2	8,0	29,9	5,5	24,5	1,5	41,7	2,4	44,7
264	50,8	11,3	53,1	15,2	19,6	22,0	8,5	68,7	2,3	39,1	8,3	22,1	5,6	35,0	2,5	51,1	2,8	36,4
265	57,5	11,1	57,5	11,1	22,2	25,4	-	-	-	-	11,9	28,1	4,2	31,9	-	-	-	-
266	54,4	13,5	54,4	13,5	22,0	15,6	-	-	-	-	11,0	16,5	5,9	30,2	-	-	-	-
267	48,1	9,7	50,6	12,1	18,6	29,3	8,1	67,3	2,5	35,0	8,0	27,3	6,4	33,4	3,7	66,1	2,6	49,9

268	60,6	15,4	60,6	15,4	29,0	25,5					11,0	31,3	9,0	47,7				
269	46,9	14,7	48,7	18,0	16,0	41,8	7,2	73,8	2,2	50,2	8,6	29,1	7,4	22,0	2,9	68,5	2,0	38,4
270	48,6	11,9	49,2	13,4	17,4	30,6	6,8	76,6	2,8	43,5	8,1	22,7	6,9	26,6	3,1	48,8	3,4	42,8
271	50,0	13,2	50,0	14,2	19,0	35,3	7,2	90,5	2,2	45,1	8,2	18,3	6,2	25,6	2,2	63,6	3,3	50,1
272	64,3	12,4	64,3	12,4	25,0	15,3	-	-	-	-	10,8	17,0	5,5	31,0	-	-	-	-
273	57,8	10,3	61,3	9,2	18,4	17,3	-	-	-	-	9,8	32,2	5,3	20,8	-	-	-	-
275	49,3	8,1	52,8	8,7	17,4	31,3	6,0	87,3	2,3	37,8	7,0	28,3	5,0	38,1	2,7	62,9	2,5	32,7
276	69,3	9,6	69,3	9,6	24,8	17,6	-	-	-	-	12,6	15,9	4,8	36,9	-	-	-	-
277	58,8	7,8	60,7	4,9	19,8	19,1	6,1	48,5	2,8	24,1	10,7	19,3	5,0	27,0	3,2	38,8	2,2	54,1
278	55,3	6,8	55,3	6,8	20,5	32,9	-	-	-	-	11,7	26,4	3,9	37,6	-	-	-	-
279	60,8	16,4	60,8	16,4	31,3	22,1	-	-	-	-	12,9	39,9	7,6	45,9	-	-	-	-
280	54,0	9,7	55,5	12,6	17,0	41,1	5,6	80,2	2,8	31,1	7,5	29,7	5,7	32,8	2,5	39,7	2,5	45,6
281	55,7	14,6	55,7	14,6	17,1	32,2	-	-	-	-	9,7	26,4	5,5	33,3	-	-	-	-
282	55,5	11,9	60,8	17,2	16,7	24,0	6,9	77,8	2,5	40,4	8,0	48,9	4,5	28,0	2,5	45,5	2,9	37,0
283	74,7	19,0	74,7	19,0	40,6	33,4	-	-	-	-	14,8	42,2	8,6	58,9	-	-	-	-
284	54,0	14,3	61,1	7,5	30,0	73,7	9,4	39,4	2,8	43,9	8,6	52,1	7,0	48,8	3,1	46,5	2,4	42,0
285	65,5	7,6	65,5	7,6	31,0	29,4	-	-	-	-	12,2	20,8	10,0	53,5	-	-	-	-
286	56,3	11,6	61,3	13,5	18,9	28,5	4,8	41,0	3,4	49,5	7,6	33,4	5,5	33,1	1,5	46,0	2,4	42,7
287	57,6	15,2	60,2	17,2	17,8	24,9	5,8	55,5	2,8	59,5	8,8	27,0	5,2	41,0	2,0	39,9	3,2	34,8
288	50,3	11,7	52,7	14,2	16,4	29,5	9,0	77,5	2,5	30,1	8,0	27,1	5,5	39,1	2,6	46,0	3,1	45,2
289	48,7	9,7	53,3	8,6	10,6	42,7	8,2	85,9	2,7	23,9	8,9	36,4	4,4	35,5	1,4	41,9	2,3	42,4
291	55,3	8,2	58,8	9,4	14,0	15,9	8,7	91,5	3,0	33,0	6,7	16,9	4,6	21,9	3,0	81,6	2,2	36,2
292	51,4	8,9	57,8	11,7	12,2	52,4	9,5	82,9	2,5	31,0	8,3	42,0	4,3	33,2	2,2	48,0	2,1	36,6
293	61,1	14,5	61,1	14,5	29,5	43,7	-	-	-	-	11,8	32,4	7,6	52,1	-	-	-	-
296	61,5	12,1	60,6	10,1	31,1	47,3	-	-	-	-	13,2	37,5	6,7	59,8	-	-	-	-
298	61,3	9,4	67,5	11,1	14,8	46,7	9,0	72,7	2,5	34,6	10,2	43,4	4,5	28,0	2,0	58,6	2,4	38,6
299	69,0	11,4	69,0	11,4	33,4	34,8	-	-	-	-	13,0	24,1	7,5	63,5	-	-	-	-
300	63,4	18,0	63,4	18,0	30,3	33,1	-	-	-	-	11,0	35,5	5,3	25,5	-	-	-	-
301	63,3	5,1	66,3	5,2	14,8	31,5	7,0	93,0	2,5	36,7	9,0	33,9	4,4	20,2	1,3	44,0	2,6	31,8
306	54,4	15,4	54,4	15,4	23,0	37,3	-	-	-	-	10,1	19,6	6,5	23,8	-	-	-	-

308	58,5	7,0	61,2	7,4	19,7	18,2	7,2	49,7	3,1	58,1	9,0	19,4	5,6	31,5	3,2	50,3	3,2	29,4
309	64,0	16,6	64,0	16,6	27,9	24,9	-	-	-	-	11,3	23,3	7,2	58,7	-	-	-	-
310	65,8	11,5	65,8	11,5	33,4	34,0	-	-	-	-	11,4	23,2	8,5	48,7	-	-	-	-
311	60,8	20,7	60,8	20,7	30,0	30,4	-	-	-	-	11,9	27,3	8,7	40,8	-	-	-	-
312	57,3	6,0	57,3	6,0	28,5	45,6	-	-	-	-	10,8	29,4	8,2	59,6	-	-	-	-
313	56,9	10,8	56,9	10,8	29,1	38,1	-	-	-	-	11,1	22,1	8,0	47,1	-	-	-	-
314	57,9	9,0	57,9	9,0	27,3	41,8	-	-	-	-	11,7	21,9	7,5	41,4	-	-	-	-
315	68,0	7,3	68,0	7,3	31,7	45,6	-	-	-	-	13,3	46,9	7,8	46,2	-	-	-	-
316	61,8	11,2	61,8	11,2	31,3	28,2	-	-	-	-	12,0	26,4	7,9	48,4	-	-	-	-
317	51,8	16,7	51,8	16,7	26,4	30,2	-	-	-	-	10,7	31,8	6,8	55,6	-	-	-	-
318	54,8	19,9	54,8	19,9	22,3	32,5	-	-	-	-	10,2	33,3	9,1	55,5	-	-	-	-
319	52,5	13,6	52,5	13,6	26,8	38,2	-	-	-	-	13,0	37,4	8,3	34,4	-	-	-	-
320	48,5	20,6	48,5	20,6	21,4	18,2	-	-	-	-	11,8	39,2	6,9	42,6	-	-	-	-
321	52,1	10,4	52,1	10,4	25,9	41,7	-	-	-	-	11,5	36,6	7,3	47,4	-	-	-	-
322	56,3	6,9	56,3	6,9	21,0	31,1	-	-	-	-	10,5	46,2	5,1	33,2	-	-	-	-
323	48,2	10,3	48,2	10,3	21,4	67,9	-	-	-	-	9,2	23,5	5,7	62,9	-	-	-	-
324	46,5	9,8	46,5	9,8	22,6	51,6	-	-	-	-	9,8	23,0	6,8	78,9	-	-	-	-
325	67,3	13,0	67,3	13,0	30,8	24,0	-	-	-	-	10,8	21,5	7,2	42,5	-	-	-	-
326	64,3	17,9	64,3	17,9	24,2	24,7	-	-	-	-	8,8	35,0	4,5	52,9	-	-	-	-
327	57,6	27,5	57,6	27,5	26,3	23,7	-	-	-	-	11,6	31,6	5,8	39,1	-	-	-	-
328	46,3	18,4	46,3	18,4	23,4	62,9	-	-	-	-	8,5	22,7	6,3	59,7	-	-	-	-
329	52,5	13,3	52,5	13,3	24,1	61,8	-	-	-	-	10,0	24,5	6,6	81,3	-	-	-	-
330	49,6	14,4	49,6	14,4	23,9	57,7	-	-	-	-	10,3	28,7	5,0	58,0	-	-	-	-
331	61,0	19,6	61,0	19,6	26,0	21,4	-	-	-	-	11,8	22,9	6,7	27,6	-	-	-	-
332	59,0	17,7	59,0	17,7	31,9	24,4	-	-	-	-	10,9	21,4	7,8	38,1	-	-	-	-
333	64,2	17,2	64,2	17,2	27,5	16,3	-	-	-	-	12,375	23,7	6,2	44,3	-	-	-	-
Emir	55,7	11,9	60,7	10,1	17,2	26,5	8,15	58,55	3,55	74,2	7,45	30,25	5,45	48,8	2,75	62,35	2,8	53,45
Lae-1	60,45	14,85	60,45	14,85	28,95	32,55	-	-	-	-	10,5	21,35	7,65	32,45	-	-	-	-
średnia	57,4		59,8		22,8		6,4		2,8		9,9		6,2		2,5		2,8	

max	74,7	75,1	40,6	10,3	4,6	14,8	10,0	4,9	4,0
min	44,0	46,2	10,6	3,5	1,8	6,5	1,1	1,3	1,9
V%	4,5	4,8	15,3	29,1	37,0	50,5	48,1	41,5	49,3

max- wartość maksymalna

min- wartość minimalna

V%- współczynnik zmienności

Tabela 14a. Zestawienie średnich wartości struktury plonu dla 108 linii RILs łubinu wąskolistnego w latach 2016 – 2018

Obiekt	Plon z poletka [kg]		MTN [g]	
	średnia	V%	średnia	V%
201	0,5	61,4	133,2	11,2
203	0,6	60,2	137,5	7,9
204	0,4	45,9	131,5	5,0
205	0,7	22,5	154,6	4,7
206	0,6	54,2	133,5	13,4
207	0,4	51,4	144,2	11,8
208	0,6	6,6	140,0	10,0
209	0,6	52,5	135,6	15,2
210	0,5	36,5	127,4	3,5
211	0,6	42,7	144,2	5,8
213	0,4	30,6	143,2	20,9
215	0,8	52,1	136,4	18,2
216	0,5	69,4	126,7	10,3
218	0,6	27,4	156,5	3,5
219	0,8	45,2	159,7	8,7
220	0,7	10,6	132,3	3,9
221	0,8	43,1	154,7	0,3
222	0,9	17,6	162,4	8,6
224	0,6	23,8	146,4	9,6
225	0,8	15,1	129,2	3,1
228	0,9	17,1	155,1	8,4
229	0,7	38,3	173,2	8,8
230	0,7	42,3	164,1	7,3
232	0,7	9,8	151,1	12,0
234	0,7	0,9	149,7	3,7
237	0,4	71,2	137,5	11,4
238	0,6	69,2	134,9	0,9
239	0,7	59,3	159,7	10,3
240	0,8	61,9	160,4	7,2
241	0,8	6,7	176,0	3,9
242	0,7	0,9	156,3	4,7
244	0,6	30,2	135,3	0,8
245	0,8	61,9	152,8	7,2
246	0,7	69,6	167,6	9,6
247	0,8	57,0	140,8	4,2
248	0,6	18,8	139,6	3,2
249	1,1	40,3	134,9	14,3
252	0,6	47,6	161,4	2,6
253	0,4	47,0	150,4	2,7
255	0,5	30,2	144,0	3,2
257	0,7	28,5	147,9	9,6
258	0,5	32,5	117,1	18,1

260	0,7	104,6	144,2	7,9
261	0,6	82,7	133,8	7,1
262	0,6	62,0	139,5	3,0
263	0,6	32,1	160,4	3,2
264	0,6	28,0	154,9	7,9
265	0,5	36,7	134,7	9,8
266	0,6	16,6	141,8	3,6
267	0,6	15,9	149,5	5,2
268	0,6	33,5	148,6	4,9
269	0,6	13,4	138,6	3,4
270	0,7	79,4	155,3	5,6
271	0,6	62,4	144,9	5,4
272	0,7	48,1	141,6	5,7
273	0,6	27,3	146,5	4,7
275	0,6	26,5	141,1	4,6
276	0,5	30,6	158,5	10,5
277	0,6	32,3	141,5	6,2
278	0,5	28,9	157,6	7,1
279	0,7	22,2	162,3	6,2
280	0,6	26,0	137,3	5,9
281	0,6	39,0	149,6	12,2
282	0,5	12,2	137,0	5,6
283	0,6	32,8	132,5	2,5
284	0,6	57,4	153,2	16,5
285	0,5	27,7	149,9	5,1
286	0,5	29,8	122,9	3,8
287	0,5	30,0	143,8	9,4
288	0,9	29,3	158,9	15,4
289	0,6	80,0	156,6	7,2
291	0,8	31,3	134,3	5,5
292	0,6	32,3	136,0	2,2
293	0,5	20,0	135,6	5,4
296	0,5	6,6	144,8	2,7
298	0,4	24,9	154,8	1,9
299	0,5	46,1	116,4	7,9
300	0,4	32,8	126,2	8,4
301	0,6	30,7	143,1	9,5
306	0,6	83,7	138,0	9,5
308	0,7	76,7	149,1	14,2
309	0,5	49,7	151,4	2,1
310	0,6	24,5	139,3	0,7
311	0,5	75,6	147,2	10,0
312	0,8	68,8	147,3	8,3
313	0,6	32,5	126,3	3,2
314	0,6	30,0	144,2	19,0
315	0,6	7,0	124,0	2,9
316	0,8	30,3	122,3	4,1

317	0,6	40,8	123,3	1,3
318	0,5	19,8	130,2	2,3
319	0,6	18,8	125,1	1,5
320	0,6	56,9	121,0	5,8
321	0,8	20,9	144,6	13,7
322	0,7	5,1	123,6	3,1
323	0,5	35,2	128,8	4,5
324	0,5	17,1	133,8	4,0
325	0,5	46,6	133,6	2,4
326	0,6	21,0	115,6	5,0
327	0,4	44,6	121,8	13,2
328	0,8	26,6	147,5	18,2
329	0,9	50,3	145,9	17,4
330	0,7	67,4	144,9	9,3
331	0,4	43,5	116,5	6,1
332	0,6	6,1	132,3	4,9
333	0,2	58,4	122,8	3,8
Emir	0,7	38,7	154,8	4,7
Lae-1	0,7	25,4	143,9	1,9
średnia	0,6		142,4	
max	1,1		176,0	
min	0,2		115,6	
V%	22,5		4,7	

max- wartość maksymalna

min- wartość minimalna

V%- współczynnik zmienności

Tabela 14b. Zestawienie średnich wartości białka i tłuszczu dla 108 genotypów łubinu w latach 2016 – 2018

Obiekt	Białko		Tłuszcz	
	średnia	V%	średnia	V%
201	34,5	4,2	7,2	11,9
203	30,5	0,8	7,4	6,6
204	31,8	7,6	7,7	12,9
205	30,9	1,7	7,2	10,1
206	31,8	0,8	7,4	12,7
207	32,0	2,2	7,9	17,7
208	32,0	6,3	7,7	10,6
209	31,4	2,6	7,6	12,1
210	31,5	6,5	7,9	7,2
211	31,0	1,2	7,7	17,8
213	32,2	5,0	8,2	12,6
215	32,1	3,6	8,0	14,5
216	31,5	5,3	7,7	11,8
218	31,3	6,6	8,0	5,1
219	31,8	4,1	7,5	10,6
220	32,2	4,4	8,0	8,1
221	33,6	2,7	6,5	1,1
222	33,1	2,0	7,1	17,6
224	31,3	4,2	8,0	8,5
225	24,7	59,3	8,3	10,4
228	31,6	2,7	7,6	13,0
229	30,3	3,0	7,5	8,1
230	30,7	2,4	7,7	14,4
232	32,0	4,3	7,2	6,1
234	32,8	1,1	7,4	14,8
237	35,1	7,9	6,8	8,9
238	31,5	3,6	7,7	12,4
239	33,1	1,3	7,2	11,9
240	32,1	5,1	8,0	14,7
241	34,6	1,4	6,9	2,0
242	31,3	3,4	7,2	11,2
244	33,9	7,7	7,3	8,3
245	31,1	4,2	8,0	14,2
246	31,3	2,0	8,3	11,6
247	33,0	1,8	7,9	9,5
248	31,7	3,3	8,3	3,9
249	31,2	1,6	7,9	4,1
252	29,3	3,2	8,2	7,4
253	32,2	1,6	8,0	19,1
255	33,8	2,1	7,9	9,7

257	31,4	4	7,2	16,1
258	31,9	3,7	7,3	19,5
260	33,7	4,2	6,8	8,1
261	32,6	2,6	7,1	12,9
262	32,6	1,4	6,9	5,0
263	33,8	6,6	7,6	8,5
264	34,4	6,7	7,6	10,3
265	33,7	1,8	7,5	13,2
266	34,4	3,4	7,3	15,8
267	33,4	3,4	7,6	8,4
268	34,8	2,1	8,0	18,3
269	33,1	5,0	7,8	9,8
270	34,5	4,4	7,4	9,5
271	33,9	6,0	7,6	9,6
272	31,5	4,5	7,1	11,8
273	31,4	1,9	7,4	7,5
275	32,5	8,4	7,7	6,9
276	31,6	4,0	7,6	11,5
277	32,6	1,3	7,4	5,9
278	29,3	3,6	8,1	15
279	31,7	4,7	7,2	4,9
280	32,7	5,1	7,9	9,4
281	32,7	3,4	7,7	6,4
282	32	4,3	8,4	4,8
283	33,8	2,4	7,2	13
284	31,0	5,1	7,7	4,9
285	32,9	4,0	8,3	15,6
286	32,7	1,8	7,8	19,3
287	33,3	2,6	7,9	18,9
288	32,9	4,1	7,6	5,3
289	31,6	4,1	7,8	7,3
291	33,4	2,1	8,0	11,3
292	33	1,4	7,8	11,1
293	32,8	0,8	7,3	15,9
296	33,0	1,7	7,4	18,8
298	31,2	5,2	8,5	9,0
299	28,7	5,5	8,5	19,8
300	31,8	1,8	8,0	16,8
301	33,1	4,2	8,1	6,8
306	33,1	9,9	7,6	11,1
308	34,7	7,4	7,1	11,2
309	34,5	4,3	7,7	22,8
310	32,0	0,8	7,9	17,5
311	31,3	5,9	7,6	22,2
312	30,7	4,8	7,7	13,4
313	31,2	6,4	7,4	8,8
314	29,7	4,8	7,9	12,7

315	29,2	1,7	7,9	12,8
316	29,1	2,0	8,0	13,9
317	32,1	3,3	7,5	8,1
318	31,2	4,0	7,7	23,8
319	31,7	0,8	7,6	15,5
320	31,9	1,6	7,5	9,3
321	32,0	4,3	7,7	9,8
322	33,0	4,8	7,6	9,2
323	31,1	4,3	7,9	13,1
324	33,4	5,7	7,7	14,1
325	32,6	3,5	8,1	16,3
326	32,9	2,1	7,6	9,3
327	33,8	3,2	7,9	16,1
328	31,5	4,7	7,7	18,4
329	33,6	1,7	8,0	20,2
330	33,1	3,1	7,9	15,4
331	31,4	2,7	8,2	18,7
332	31,9	2,7	8,0	10,2
333	35,9	2,4	6,8	20,9
Emir	32,8	1,8	8,2	10,2
Lae-1	33,9	2,5	7,6	14,3
średnia	32,2		7,7	
max	35,9		8,9	
min	24,7		6,5	
V%	4,8		5,3	

max- wartość maksymalna

min- wartość minimalna

V%- współczynnik zmienności

Tabela 15a. Podział 108 linii RILs łubinu wąskolistnego za pomocą dendrogramu- Klaster A

Obiekt	Wysokość pędu głównego	Wysokość całej rośliny	Długość kwiatostanu pędu głównego	Liczba okółków na pędzie głównym	Liczba zawiązanych strąków na pędzie głównym	Plon z poletka [kg]	MTN [g]
	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia
203	58,0	58,5	29,2	8,7	8,0	0,6	137,5
211	62,0	62,0	30,6	11,1	7,4	0,6	144,2
215	61,6	61,6	26,3	11,6	6,6	0,8	136,4
216	64,6	64,6	28,0	14,3	7,7	0,5	126,7
240	61,2	61,2	30,4	10,3	7,0	0,8	160,4
245	70,3	70,3	30,7	11,5	7,1	0,8	152,8
246	67,4	67,4	33,8	10,5	6,3	0,7	167,6
257	60,9	60,9	33,1	11,9	7,8	0,7	147,9
258	60,2	60,2	30,7	11,0	7,1	0,5	117,1
260	64,9	64,9	25,3	11,0	7,2	0,7	144,2
261	64,5	64,5	25,8	11,0	5,8	0,6	133,8
262	66,1	66,1	27,8	10,3	7,5	0,6	139,5
268	60,6	60,6	29,0	11,0	9,0	0,6	148,6
272	64,3	64,3	25,0	10,8	5,5	0,7	141,6
276	69,3	69,3	24,8	12,6	4,8	0,5	158,5
279	60,8	60,8	31,3	12,9	7,6	0,7	162,3
283	74,7	74,7	40,6	14,8	8,6	0,6	132,5
284	54,0	61,1	30,0	8,6	7,0	0,6	153,2
285	65,5	65,5	31,0	12,2	10,0	0,5	149,9
293	61,1	61,1	29,5	11,8	7,6	0,5	135,6

296	61,5	60,6	31,1	13,2	6,7	0,5	144,8
299	69,0	69,0	33,4	13,0	7,5	0,5	116,4
300	63,4	63,4	30,3	11,0	5,3	0,4	126,2
309	64,0	64,0	27,9	11,3	7,2	0,5	151,4
310	65,8	65,8	33,4	11,4	8,5	0,6	139,3
311	60,8	60,8	30,0	11,9	8,7	0,5	147,2
315	68,0	68,0	31,7	13,3	7,8	0,6	124,0
316	61,8	61,8	31,3	12,0	7,9	0,8	122,3
325	67,3	67,3	30,8	10,8	7,2	0,5	133,6
327	57,6	57,6	26,3	11,6	5,8	0,4	121,8
331	61,0	61,0	26,0	11,8	6,7	0,4	116,5
332	59,0	59,0	31,9	10,9	7,8	0,6	132,3
333	64,2	64,2	27,5	12,4	6,2	0,2	122,8
średnia	63,5	63,7	29,8	11,6	7,2	0,6	139,1

Tabela 15b. Podział 108 linii RILs łubinu wąskolistnego za pomocą dendrogramu - Klaster B

Obiekt	Wysokość pedu głównego	Wysokość całej rośliny	Długość kwiatostanu pedu głównego	Liczba okółków na pędzie głównym	Liczba zawiązanych strąków na pędzie głównym	Plon z poletka [kg]	MTN [g]
	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia
205	58,0	68,1	20,4	9,3	5,3	0,7	154,6
213	53,9	61,8	17,0	9,0	5,1	0,4	143,2
218	56,5	61,3	16,8	8,4	5,5	0,6	156,5
219	59,9	65,2	21,6	7,7	4,9	0,8	159,7
220	53,0	57,3	17,3	9,3	5,8	0,7	132,3
221	61,9	68,8	20,5	8,1	5,8	0,8	154,7
222	60,2	67,0	20,2	8,8	5,0	0,9	162,4
224	58,7	64,7	19,3	10,0	7,0	0,6	146,4
225	56,6	59,3	19,2	9,1	6,1	0,8	129,2
228	59,8	75,1	19,2	7,3	5,0	0,9	155,1
229	64,4	72,3	21,5	9,8	6,0	0,7	173,2
230	65,0	73,2	19,4	7,9	5,2	0,7	164,1
232	64,1	72,0	19,0	10,3	5,7	0,7	151,1
234	58,6	69,4	18,0	6,9	4,1	0,7	149,7
239	53,5	63,4	19,9	10,4	5,8	0,7	159,7
241	64,8	72,9	20,3	8,9	5,8	0,8	176,0
242	60,8	66,1	18,2	8,0	4,4	0,7	156,3
248	51,0	55,4	13,8	7,3	3,8	0,6	139,6
249	56,5	60,0	15,8	8,0	4,4	1,1	134,9

252	58,0	62,1	17,0	10,1	5,2	0,6	161,4
253	65,7	65,7	24,1	9,0	6,3	0,4	150,4
265	57,5	57,5	22,2	11,9	4,2	0,5	134,7
273	57,8	61,3	18,4	9,8	5,3	0,6	146,5
277	58,8	60,7	19,8	10,7	5,0	0,6	141,5
278	55,3	55,3	20,5	11,7	3,9	0,5	157,6
282	55,5	60,8	16,7	8,0	4,5	0,5	137,0
286	56,3	61,3	18,9	7,6	5,5	0,5	122,9
287	57,6	60,2	17,8	8,8	5,2	0,5	143,8
291	55,3	58,8	14,0	6,7	4,6	0,8	134,3
292	51,4	57,8	12,2	8,3	4,3	0,6	136,0
298	61,3	67,5	14,8	10,2	4,5	0,4	154,8
301	63,3	66,3	14,8	9,0	4,4	0,6	143,1
308	58,5	61,2	19,7	9,0	5,6	0,7	149,1
322	56,3	56,3	21,0	10,5	5,1	0,7	123,6
326	64,3	64,3	24,2	8,8	4,5	0,6	115,6
średnia	58,6	63,7	18,7	9,0	5,1	0,7	147,2

Tabela 15c. Podział 108 linii RILs łubinu wąskolistnego za pomocą dendrogramu- Klaster C

Obiekt	Wysokość pędu głównego	Wysokość całej rośliny	Długość kwiatostanu pędu głównego	Liczba okółków na pędzie głównym	Liczba zawiązanych strąków na pędzie głównym	Plon z poletka [kg]	MTN [g]
	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia
204	48,3	53,4	14,0	7,5	4,9	0,4	131,5
208	47,0	55,9	16,7	7,9	4,6	0,6	140,0
210	44,0	50,7	14,7	7,5	3,8	0,5	127,4
237	48,4	51,3	14,3	8,0	5,3	0,4	137,5
238	50,5	55,4	16,3	8,6	6,5	0,6	134,9
244	52,1	56,3	15,1	7,5	5,4	0,6	135,3
247	52,3	53,3	19,4	8,5	3,7	0,8	140,8
263	54,2	59,3	15,5	8,0	5,5	0,6	160,4
264	50,8	53,1	19,6	8,3	5,6	0,6	154,9
267	48,1	50,6	18,6	8,0	6,4	0,6	149,5
269	46,9	48,7	16,0	8,6	7,4	0,6	138,6
270	48,6	49,2	17,4	8,1	6,9	0,7	155,3
271	50,0	50,0	19,0	8,2	6,2	0,6	144,9
275	49,3	52,8	17,4	7,0	5,0	0,6	141,1
280	54,0	55,5	17,0	7,5	5,7	0,6	137,3
288	50,3	52,7	16,4	8,0	5,5	0,9	158,9
289	48,7	53,3	10,6	8,9	4,4	0,6	156,6
średnia	55,6	57,6	22,3	9,6	6,2	0,6	137,9

Tabela 15d. Podział 108 linii RILs łubinu wąskolistnego za pomocą dendrogramu- Klaster D

Obiekt	Wysokość pędu głównego	Wysokość całej rośliny	Długość kwiatostanu pędu głównego	Liczba okółków na pędzie głównym	Liczba zawiązanych strąków na pędzie głównym	Plon z poletka [kg]	MTN [g]
	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia
201	54,5	54,5	27,1	12,1	6,7	0,5	133,2
206	54,8	54,8	25,1	13,2	7,1	0,6	133,5
207	54,3	54,3	23,8	11,2	7,7	0,4	144,2
209	46,2	46,2	26,1	9,3	7,6	0,6	135,6
255	49,0	49,0	15,9	6,5	1,1	0,5	144,0
266	54,4	54,4	22,0	11,0	5,9	0,6	141,8
306	54,4	54,4	23,0	10,1	6,5	0,6	138,0
312	57,3	57,3	28,5	10,8	8,2	0,8	147,3
313	56,9	56,9	29,1	11,1	8,0	0,6	126,3
314	57,9	57,9	27,3	11,7	7,5	0,6	144,2
317	51,8	51,8	26,4	10,7	6,8	0,6	123,3
318	54,8	54,8	22,3	10,2	9,1	0,5	130,2
319	52,5	52,5	26,8	13,0	8,3	0,6	125,1
320	48,5	48,5	21,4	11,8	6,9	0,6	121,0
321	52,1	52,1	25,9	11,5	7,3	0,8	144,6
323	48,2	48,2	21,4	9,2	5,7	0,5	128,8
324	46,5	46,5	22,6	9,8	6,8	0,5	133,8
328	46,3	46,3	23,4	8,5	6,3	0,8	147,5
329	52,5	52,5	24,1	10,0	6,6	0,9	145,9
330	49,6	49,6	23,9	10,3	5,0	0,7	144,9
średnia	52,1	52,1	24,3	10,6	6,8	0,6	136,7

Tabela 16. Zestawienie składowych głównych i ich udział w zmienności badanej populacji

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7
Odchylenie standardowe	1,8*	1,4*	0,9	0,6	0,6	0,4	0,2
Udział w zmienności	0,5	0,3	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0
Łączny udział	0,5	0,7	0,9	0,9	1,0	1,0	1,0

*- największy udział w obserwowanej zmienności

Tabela 17. Udzyał analiza cech morfologicznych i plonu w składowych głównych

Cechy	Składowe główne						
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7
Wysokość pędu głównego	0,50*	-0,22	0,31	0,13	0,17	0,01	0,75
Wysokość całej rośliny	0,38	-0,43*	0,29	0,15	0,36	0,24	-0,61
Długość kwiatostanu pędu głównego	0,47*	0,29	-0,01	-0,08	0,06	-0,80	-0,21
Liczba okółków na pędzie głównym	0,40	0,35	0,26	0,12	-0,71	0,33	-0,13
Liczba zawiązanych strąków na pędzie głównym	0,36	0,38	-0,36	-0,53	0,36	0,43	0,03
Plon	0,29	-0,25	-0,78	0,46	-0,16	0,03	0,02
MTN	0,12	-0,59*	-0,08	-0,67	-0,42	-0,11	-0,01

*- największy udział w obserwowanej zmienności

Tabela 18a. Analiza składowych głównych (PCA) 108 linii RILs łubinu wąskolistnego- Klaster A

Obiekt	Wysokość pedu głównego	Wysokość całej rośliny	Długość kwiatostanu pędu głównego	Liczba okółków na pędzie głównym	Liczba zawiązanych strąków na pędzie głównym	Plon z poletka [kg]	MTN [g]
	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia
205	58,0	68,1	20,4	9,3	5,3	0,7	154,6
213	53,9	61,8	17,0	9,0	5,1	0,4	143,2
218	56,5	61,3	16,8	8,4	5,5	0,6	156,5
219	59,9	65,2	21,6	7,7	4,9	0,8	159,7
221	61,9	68,8	20,5	8,1	5,8	0,8	154,7
222	60,2	67,0	20,2	8,8	5,0	0,9	162,4
224	58,7	64,7	19,3	10,0	7,0	0,6	146,4
228	59,8	75,1	19,2	7,3	5,0	0,9	155,1
229	64,4	72,3	21,5	9,8	6,0	0,7	173,2
230	65,0	73,2	19,4	7,9	5,2	0,7	164,1
232	64,1	72,0	19,0	10,3	5,7	0,7	151,1
234	58,6	69,4	18,0	6,9	4,1	0,7	149,7
239	53,5	63,4	19,9	10,4	5,8	0,7	159,7
241	64,8	72,9	20,3	8,9	5,8	0,8	176,0
242	60,8	66,1	18,2	8,0	4,4	0,7	156,3
252	58,0	62,1	17,0	10,1	5,2	0,6	161,4
253	65,7	65,7	24,1	9,0	6,3	0,4	150,4
261	64,5	64,5	25,8	11,0	5,8	0,6	133,8
265	57,5	57,5	22,2	11,9	4,2	0,5	134,7

272	64,3	64,3	25,0	10,8	5,5	0,7	141,6
273	57,8	61,3	18,4	9,8	5,3	0,6	146,5
276	69,3	69,3	24,8	12,6	4,8	0,5	158,5
277	58,8	60,7	19,8	10,7	5,0	0,6	141,5
282	55,5	60,8	16,7	8,0	4,5	0,5	137,0
286	56,3	61,3	18,9	7,6	5,5	0,5	122,9
287	57,6	60,2	17,8	8,8	5,2	0,5	143,8
298	61,3	67,5	14,8	10,2	4,5	0,4	154,8
301	63,3	66,3	14,8	9,0	4,4	0,6	143,1
308	58,5	61,2	19,7	9,0	5,6	0,7	149,1
326	64,3	64,3	24,2	8,8	4,5	0,6	115,6
średnia	60,4	65,6	19,8	9,3	5,2	0,6	149,9

Tabela 18b. Analiza składowych głównych (PCA) 108 linii RILs łubinu wąskolistnego- Klaster B

Obiekt	Wysokość pędu głównego	Wysokość całej rośliny	Długość kwiatostanu pędu głównego	Liczba okółków na pędzie głównym	Liczba zawiązanych strąków na pędzie głównym	Plon z poletka [kg]	MTN [g]
	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia
201	54,5	54,5	27,1	12,1	6,7	0,5	133,2
204	48,3	53,4	14,0	7,5	4,9	0,4	131,5
207	54,3	54,3	23,8	11,2	7,7	0,4	144,2
208	47,0	55,9	16,7	7,9	4,6	0,6	140,0
209	46,2	46,2	26,1	9,3	7,6	0,6	135,6
220	53,0	57,3	17,3	9,3	5,8	0,7	132,3
225	56,6	59,3	19,2	9,1	6,1	0,8	129,2
237	48,4	51,3	14,3	8,0	5,3	0,4	137,5
238	50,5	55,4	16,3	8,6	6,5	0,6	134,9
244	52,1	56,3	15,1	7,5	5,4	0,6	135,3
247	52,3	53,3	19,4	8,5	3,7	0,8	140,8
248	51,0	55,4	13,8	7,3	3,8	0,6	139,6
249	56,5	60,0	15,8	8,0	4,4	1,1	134,9
255	49,0	49,0	15,9	6,5	1,1	0,5	144,0
263	54,2	59,3	15,5	8,0	5,5	0,6	133,8
264	50,8	53,1	19,6	8,3	5,6	0,6	160,4
266	54,4	54,4	22,0	11,0	5,9	0,6	154,9
267	48,1	50,6	18,6	8,0	6,4	0,6	141,8
269	46,9	48,7	16,0	8,6	7,4	0,6	149,5

270	48,6	49,2	17,4	8,1	6,9	0,6	138,6
271	50,0	50,0	19,0	8,2	6,2	0,7	155,3
275	49,3	52,8	17,4	7,0	5,0	0,6	144,9
278	55,3	55,3	20,5	11,7	3,9	0,6	141,1
280	54,0	55,5	17,0	7,5	5,7	0,5	157,6
284	54,0	61,1	30,0	8,6	7,0	0,6	137,3
288	50,3	52,7	16,4	8,0	5,5	0,6	153,2
289	48,7	53,3	10,6	8,9	4,4	0,9	158,9
291	55,3	58,8	14,0	6,7	4,6	0,6	156,6
292	51,4	57,8	12,2	8,3	4,3	0,8	134,3
306	54,4	54,4	23,0	10,1	6,5	0,6	136,0
317	51,8	51,8	26,4	10,7	6,8	0,6	138,0
320	48,5	48,5	21,4	11,8	6,9	0,6	123,3
321	52,1	52,1	25,9	11,5	7,3	0,6	121,0
322	56,3	56,3	21,0	10,5	5,1	0,8	144,6
323	48,2	48,2	21,4	9,2	5,7	0,7	123,6
324	46,5	46,5	22,6	9,8	6,8	0,5	128,8
328	46,3	46,3	23,4	8,5	6,3	0,5	133,8
329	52,5	52,5	24,1	10,0	6,6	0,9	145,9
330	49,6	49,6	23,9	10,3	5,0	0,7	144,9
średnia	51,0	53,3	19,2	8,9	5,6	0,6	140,3

Tabela18c. Analiza składowych głównych (PCA) 108 linii RILs łubinu wąskolistnego- Klaster C

Obiekt	Wysokość pedu głównego	Wysokość całej rośliny	Długość kwiatostanu pedu głównego	Liczba okółków na pędzie głównym/ liczba kwiatów	Liczba zawiązanych strąków na pędzie głównym	Plon z poletka [kg]	MTN [g]
	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia	średnia
203	58,0	58,5	29,2	8,7	8,0	0,6	137,5
206	54,8	54,8	25,1	13,2	7,1	0,6	133,5
211	62,0	62,0	30,6	11,1	7,4	0,6	144,2
215	61,6	61,6	26,3	11,6	6,6	0,8	136,4
216	64,6	64,6	28,0	14,3	7,7	0,5	126,7
240	61,2	61,2	30,4	10,3	7,0	0,8	160,4
245	70,3	70,3	30,7	11,5	7,1	0,8	152,8
246	67,4	67,4	33,8	10,5	6,3	0,7	167,6
247	52,3	53,3	19,4	8,5	3,7	0,7	147,9
258	60,2	60,2	30,7	11,0	7,1	0,5	117,1
260	64,9	64,9	25,3	11,0	7,2	0,7	144,2
262	66,1	66,1	27,8	10,3	7,5	0,6	139,5
268	60,6	60,6	29,0	11,0	9,0	0,6	148,6
279	60,8	60,8	31,3	12,9	7,6	0,7	162,3
293	61,1	61,1	29,5	11,8	7,6	0,5	135,6
296	61,5	60,6	31,1	13,2	6,7	0,5	144,8
299	69,0	69,0	33,4	13,0	7,5	0,5	116,4
300	63,4	63,4	30,3	11,0	5,3	0,4	126,2
309	64,0	64,0	27,9	11,3	7,2	0,5	151,4

310	65,8	65,8	33,4	11,4	8,5	0,6	139,3
311	60,8	60,8	30,0	11,9	8,7	0,5	147,2
312	57,3	57,3	28,5	10,8	8,2	0,8	147,3
313	56,9	56,9	29,1	11,1	8,0	0,6	126,3
314	57,9	57,9	27,3	11,7	7,5	0,6	144,2
315	68,0	68,0	31,7	13,3	7,8	0,6	124,0
316	61,8	61,8	31,3	12,0	7,9	0,8	122,3
318	54,8	54,8	22,3	10,2	9,1	0,5	130,2
319	52,5	52,5	26,8	13,0	8,3	0,6	125,1
325	67,3	67,3	30,8	10,8	7,2	0,5	133,6
327	57,6	57,6	26,3	11,6	5,8	0,4	121,8
331	61,0	61,0	26,0	11,8	6,7	0,4	116,5
332	59,0	59,0	31,9	10,9	7,8	0,6	132,3
333	64,2	64,2	27,5	12,3	6,2	0,2	122,8
średnia	62,0	62,0	29,3	11,6	7,4	0,6	137,2

Tabela 19. Procentowy udział znamion z osadzonym pyłkiem linii induktora *L. luteus* 500,501,Przebędowo oraz intensywność jego osadzania się na znamionach czterech genotypów *L. angustifolius* L.- ‘Emir’, ‘Graf’, ‘Karo’ i Lae-1

Wariant krzyżowania	Emir x 500			Emir x 501			Emir x Przebędowo			Średnia
Czas obserwacji	48 h	96 h	średnia	48 h	96 h	średnia	48 h	96 h	średnia	
% udział znamion z osadzonym pyłkiem	80	86	82,9	75	100	87,5	66,7	50	58,3	76,2
Intensywność osadzenia się pyłku na znamieniu skala 1-3	1	1,2	1,1	1,7	0,75	1,2	0,75	1,5	1,1	
Wariant krzyżowania	Graf x 500			Graf x 501			Graf x Przebędowo			
Czas zebrania strąków	48 h	96 h	średnia	48 h	96 h	średnia	48 h	96 h	średnia	
% udział znamion z osadzonym pyłkiem	42,9	85,7	64,3	57,1	75	66,1	100	75	87,5	
Intensywność osadzenia się pyłku na znamieniu skala 1-3	1	1	1,0	1,25	1,3	1,0	1,7	1,7	1,7	
Wariant krzyżowania	Karo x 500			Karo x 501			Karo x Przebędowo			97,9
Czas zebrania strąków	48 h	96 h	średnia	48 h	96 h	średnia	48 h	96 h	średnia	
% udział znamion z osadzonym pyłkiem	87,5	100	93,8	100	100	100	100	100	100	
Intensywność osadzenia się pyłku na znamieniu skala 1-3	1,3	1,5	1,4	1,4	1,8	1,6	1,25	1,75	1,5	
Wariant krzyżowania	Lae-1 x 500			Lae-1 x 501			Lae-1 x Przebędowo			79
Czas zebrania strąków	48 h	96 h	średnia	48 h	96 h	średnia	48 h	96 h	średnia	
% udział znamion z osadzonym pyłkiem	100	66,7	83,3	57,1	100	78,6	100	50	75	
Intensywność osadzenia się pyłku na znamieniu skala 1-3	1,25	1	1,1	1,8	2	1,2	1,5	1	1,25	

Tabela 20 . Obserwacje woreczka zalążkowego na preparatach trwałych odmiany Karo po przepyleniu induktorem *L. luteus*

Oznaczenie	Genotyp	Linia induktora	Czas zbioru słupków	Liczba zalążków	Obserwacje	Zdjęcie
L1	Karo	<i>L. luteus 500</i>	48 h	12	Nie stwierdzono żadnych zmian w woreczkach zalążkowych	2A
L2			96 h	9	Widoczna komórka jajowa	2B
L3			168 h	9	Rozpoczęty proces degradacji woreczka zalążkowego	2C
L4	Karo	<i>L. luteus 501</i>	48 h	10	Nie stwierdzono żadnych zmian w woreczkach zalążkowych	-
L5			96 h	11	Widoczna degradacja w woreczkach zalążkowych	3A
L6			168 h	5	Widoczny zarodek	3B 3C
L7	Karo	<i>L. luteus Przebędowo</i>	48 h	8	Podziały komórkowe	4A
L8			96 h	8	Struktura kilkukomórkowa	4B
L9			168 h	12	Tworzący się zarodek	4C

Tabela 21. Wartości średnich kwadratów dla obserwowanych załączków czterech genotypów *L. angustifolius* po zastosowaniu trzech linii induktorów *L. luteus* po 7, 14, 21 i 30 dniach prowadzenia kultury *in vitro*

Źródło zmienności	Stopnie swobody	Jednowymiarowe testy istotności dla % załączków ze zmianami				Jednowymiarowe testy istotności dla % kalusów - 30 dni
		7 dni	14 dni	21 dni	30 dni	
		średni kwadrat	średni kwadrat	średni kwadrat	średni kwadrat	średni kwadrat
Genotyp formy matecznej	3	307,3 *	549,0	799,3 *	1299,6 *	1087,8 *
Linia induktora	2	665,2 *	2641,0 *	1652,3 *	1657,8 *	1167,0 *
Pożywka	2	549,5 *	105,0	481,1	110,4	54,6
Genotyp formy matecznej*Linia induktora	6	365,7 *	1099,0 *	264,6	203,1	165,5
Genotyp formy matecznej*Pożywka	6	269,5 *	886,0 *	2002,0 *	2131,5 *	1069,1 *
Linia induktora*Pożywka	4	392,6 *	601,0 *	608,0 *	472,1 *	576,6 *
Genotyp formy matecznej*Linia induktora*Pożywka	12	520,4 *	1189,0 *	1271,3 *	1308,1 *	1574,5 *
Błąd	35	95,1	197,6	188,1	173,6	206,5

*- istotność na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 22. Wartości średnie dla obserwowanych zalążków czterech genotypów *L. angustifolius* po 7, 14, 21 i 30 dniach prowadzenia kultury

Genotyp formy matecznej	% zalążków ze zmianami								% kalusów- 30 dni	
	7 dni		14 dni		21 dni		30 dni			
Emir	21,8	ab	56,3	a	68,6	ab	89,2	b	69,8	ab
Graf	23,6	a	46,7	a	65,2	b	72,8	a	68,4	b
Karo	13,9	b	45,9	a	78,9	a	83,0	ab	81,8	a
Lae-1	22,3	ab	54,5	a	74,6	ab	73,2	a	81,4	ab
średnia	20,4		50,9		71,8		79,5		75,4	
NIR	8,7		nie ist.		9,6		14,3		12,7	

a,b,c- grupy jednorodne na podstawie testu Tukeya

Tabela 23. Wartości średnie dla obserwowanych zalążków czterech genotypów *L. angustifolius* po 7, 14, 21 i 30 dniach uzyskanych przy zastosowaniu trzech linii induktorów *L. luteus*

Linia induktora	% zalążków ze zmianami								% kalusów- 30 dni	
	7 dni		14 dni		21 dni		30 dni			
500	26,2	a	61,5	a	80,7	a	87,5	a	80,2	a
501	18,1	b	50,1	b	68,9	b	78,8	ab	77,7	ab
Przebądowo	16,7	b	40,8	b	65,8	b	72,2	b	68,2	b
średnia	20,3		50,8		71,8		79,5		75,4	
NIR	8,1		10,6		8,5		14,1		10,2	

a,b,c- grupy jednorodne na podstawie testu Tukeya

Tabela 24. Wartości średnie dla obserwowanych zalążków czterech genotypów *L. angustifolius* po 7, 14, 21 i 30 dniach prowadzenia kultury na trzech podłożach hodowlanych

Pożywka	%zalążków ze zmianami				%kalusów- 30 dni	
	7 dni		14 dni	21 dni		30 dni
P1_B5+AC	25,4	a	52,4	75,3	81,1	74,1
P2_NLN	16,0	b	48,3	66,5	76,8	73,8
P3-ML6	19,7	ab	52,1	74,0	81,0	78,6
średnia	20,4		50,9	71,9	79,6	75,5
NIR	7,3		n.ist.	n.ist.	n.ist.	n.ist.

a,b,c- grupy jednorodne na podstawie testu Tukeya

Tabela 25. Wartości średnie dla obserwowanych zalążków czterech genotypów *L. angustifolius* po zastosowaniu trzech linii induktora *L. luteus* po 7, 14, 21 i 30 dniach prowadzenia kultury

Genotyp formy matecznej	Linia induktora	% zalążków ze zmianami				% kalusów- 30 dni		
		7 dni		14 dni			21 dni	30 dni
Emir	500	32,0	a	62,7	a	76,8	86,7	77,8
Emir	501	21,7	ab	54,4	a	64,8	66,8	66,8
Emir	Przebędowo	11,7	b	51,7	a	64,1	64,7	64,7
Graf	500	22,0	a	57,9	a	78,3	82,1	69,3
Graf	501	17,1	a	39,2	b	60,7	73,7	76,0
Graf	Przebędowo	33,4	a	42,2	ab	54,7	61,8	58,3
Karo	500	28,7	a	63,7	a	84,2	91,5	87,0
Karo	501	9,3	b	60,8	a	84,8	94,6	87,7
Karo	Przebędowo	3,8	b	13,4	b	67,8	81,2	70,8
Lae-1	500	22,2	a	61,8	a	83,5	89,6	86,8
Lae-1	501	23,9	a	45,9	a	65,3	80,2	80,2
Lae-1	Przebędowo	20,8	a	55,9	a	74,8	79,2	77,4
średnia		20,5		50,8		71,6	79,3	75,2
NIR		19,3		31,2		n.ist	n.ist	n.ist

a,b,c- grupy jednorodne na podstawie testu Tukeya

Tabela 26. Wartości średnie dla obserwowanych zalążków czterech genotypów *L. angustifolius* po 7, 14, 21 i 30 dniach na trzech podłożach hodowlanych

Genotyp formy matecznej	Pożywka	% zalążków ze zmianami								% kalusów- 30 dni	
		7 dni		14 dni		21 dni		30 dni			
Emir	P1_B5+AC	20,2	a	42,9	a	51,3	c	53,8	b	53,8	a
Emir	P2_NLN	18,3	a	56,1	a	68,8	b	74,3	ab	74,3	a
Emir	P3-ML6	26,9	a	70,0	a	85,8	a	90,3	a	81,4	a
Graf	P1_B5+AC	38,0	a	51,8	a	90,6	a	97,2	a	80,5	a
Graf	P2_NLN	17,5	b	51,8	a	62,4	b	74,0	b	71,8	a
Graf	P3-ML6	13,8	b	34,7	a	38,0	c	43,4	c	50,2	a
Karo	P1_B5+AC	16,6	a	58,9	a	86,1	a	92,1	a	81,7	a
Karo	P2_NLN	12,0	a	39,5	a	65,5	b	82,7	a	75,4	a
Karo	P3-ML6	13,3	a	39,6	a	85,3	a	92,7	a	88,5	a
Lae-1	P1_B5+AC	27,0	a	56,2	a	73,4	b	81,3	a	80,7	a
Lae-1	P2_NLN	16,3	a	46,1	a	69,4	ab	76,3	a	74,1	a
Lae-1	P3-ML6	23,8	a	61,4	a	81,0	a	91,5	a	89,7	a
średnia		20,3		50,7		71,5		79,1		75,2	
NIR		19,3		28,4		16,2		21,6		32,1	

a,b,c- grupy jednorodne na podstawie testu Tukeya

Tabela 27. Wartości średnie dla obserwowanych zalążków po 7, 14, 21 i 30 dniach po zastosowaniu trzech linii induktora *L. luteus* na trzech podłożach hodowlanych

Linia induktora	Pożywka	% zalążków ze zmianami								% kalusów- 30 dni	
		7 dni		14 dni		21 dni		30 dni			
500	P1_B5+AC	28,3	a	59,0	a	85,7	a	90,7	a	82,6	a
500	P2_NLN	17,8	a	65,0	a	80,1	a	87,0	a	83,0	a
500	P3-ML6	32,5	a	60,6	a	76,3	a	84,7	a	75,0	a
501	P1_B5+AC	20,4	a	60,0	a	79,1	a	84,7	a	82,0	a
501	P2_NLN	20,4	a	47,7	ab	64,2	a	80,4	a	75,6	a
501	P3-ML6	13,2	a	42,5	b	63,5	a	71,3	a	75,4	a
Przebędowo	P1_B5+AC	27,4	a	38,2	b	61,2	b	67,7	ab	57,7	b
Przebędowo	P2_NLN	9,8	b	32,2	b	55,1	b	62,9	b	62,9	ab
Przebędowo	P3-ML6	12,4	ab	53,4	a	83,4	a	87,9	a	86,3	a
średnia		20,3		51,0		72,0		79,7		75,6	
NIR		16,2		14,2		21,1		22,8		24,4	

a,b,c- grupy jednorodne na podstawie testu Tukeya

Tabela 28. Wartości średnie dla obserwowanych załączków czterech genotypów *L. angustifolius* po zastosowaniu trzech linii induktora *L. luteus* na trzech podłożach hodowlanych po 7, 14, 21 i 30 dniach prowadzenia kultury

Genotyp formy matecznej	Linia induktora	Pożywka	% załączków ze zmianami								% kalusów- 30 dni	
			7 dni		14 dni		21 dni		30 dni			
Emir	500	P1_B5+AC	25,7	bc	53,7	abcdef	78,8	abc	86,3	abcd	86,3	ab
Emir	500	P2_NLN	27,9	bc	62,9	abcdef	73,2	abcd	87,9	abcd	87,9	ab
Emir	500	P3-ML6	42,5	ab	71,7	abc	78,7	abc	86,0	abcd	59,3	abc
Emir	501	P1_B5+AC	35,0	abc	75,0	abc	75,0	abcd	75,0	abcde	75,0	ab
Emir	501	P2_NLN	7,4	bc	34,6	abcdef	40,7	bcde	40,7	cddef	40,8	abc
Emir	501	P3-ML6	22,8	bc	53,6	abcdef	78,7	abc	84,8	abcd	84,8	ab
Emir	Przebędowo	P1_B5+AC	0,0	c	0,0	f	0,0	e	0,0	f	0,0	c
Emir	Przebędowo	P2_NLN	19,7	bc	70,8	abc	92,4	ab	94,2	abc	94,2	ab
Emir	Przebędowo	P3-ML6	15,5	bc	84,5	ab	100,0	a	100,0	a	100,0	a
Graf	500	P1_B5+AC	27,8	bc	47,2	abcdef	91,7	ab	91,7	abcd	61,1	ab
Graf	500	P2_NLN	15,5	bc	75,5	abc	82,8	abc	89,9	abcd	83,2	ab
Graf	500	P3-ML6	22,8	bc	51,3	abcdef	60,6	abcd	64,9	abcde	63,8	ab
Graf	501	P1_B5+AC	11,1	bc	33,3	abcdef	88,9	ab	100,0	a	88,9	ab
Graf	501	P2_NLN	31,3	bc	62,5	abcdef	75,0	abcd	93,8	abc	93,8	ab
Graf	501	P3-ML6	9,1	bc	22,0	cdef	18,2	de	27,5	ef	45,5	abc
Graf	Przebędowo	P1_B5+AC	75,0	a	75,0	abc	91,4	ab	100,0	a	91,4	ab
Graf	Przebędowo	P2_NLN	5,9	bc	17,4	cdef	29,3	cde	38,4	def	38,4	bc
Graf	Przebędowo	P3-ML6	5,4	bc	26,7	abcdef	32,4	bcde	32,4	bcdef	32,4	bc
Karo	500	P1_B5+AC	35,4	abc	64,6	abcdef	76,4	abc	88,2	abcd	88,2	ab
Karo	500	P2_NLN	10,8	bc	67,7	abcd	89,5	ab	95,3	abc	92,8	ab

Karo	500	P3-ML6	40,0	abc	58,9	abcdef	86,7	ab	91,1	abcd	80,0	ab
Karo	501	P1_B5+AC	5,0	bc	90,4	a	97,5	ab	97,5	ab	97,5	ab
Karo	501	P2_NLN	23,1	bc	40,2	abcdef	63,8	abcd	91,0	abcd	71,6	ab
Karo	501	P3-ML6	0,0	c	51,9	abcdef	93,4	ab	95,4	abc	94,0	ab
Karo	Przebędowo	P1_B5+AC	9,4	bc	21,9	cdef	84,4	abc	90,6	abcd	59,4	abc
Karo	Przebędowo	P2_NLN	2,2	bc	10,5	def	43,3	abcde	61,7	abcde	61,7	ab
Karo	Przebędowo	P3-ML6	0,0	c	7,9	ef	75,8	abc	91,5	abcd	91,5	ab
Lae-1	500	P1_B5+AC	24,6	bc	70,6	abc	96,0	ab	96,9	ab	95,2	ab
Lae-1	500	P2_NLN	17,4	bc	54,3	abcdef	75,1	abcd	75,1	abcde	68,4	ab
Lae-1	500	P3-ML6	24,8	bc	60,5	abcdef	79,4	abc	96,9	ab	96,9	ab
Lae-1	501	P1_B5+AC	30,8	bc	41,7	abcdef	55,0	abcde	66,7	abcde	66,7	ab
Lae-1	501	P2_NLN	19,8	bc	53,6	abcdef	77,4	abc	96,4	ab	96,4	ab
Lae-1	501	P3-ML6	21,3	bc	42,5	abcdef	63,8	abcd	77,5	abcde	77,5	ab
Lae-1	Przebędowo	P1_B5+AC	25,5	bc	56,3	abcdef	69,1	abcd	80,4	abcde	80,4	ab
Lae-1	Przebędowo	P2_NLN	11,7	bc	30,4	abcdef	55,6	abcde	57,4	abcde	57,4	abc
Lae-1	Przebędowo	P3-ML6	25,3	bc	81,2	ab	100,0	a	100,0	a	94,6	ab
średnia			20,2		50,6		71,4		79,0		74,9	
NIR			41,3		65,1		57,1		43,1		60,3	

a,b,c- grupy jednorodne na podstawie testu Tukeya

Tabela 29. Średnia kwadranty z trójczynnikowej analizy wariancji dla genotypów *L. angustifolius* L. wykorzystanych do indukcji androgenozy

Zmienność	Stopnie swobody	% struktur			
		jedno komórkowe	2-4 komórkowe	wielokomórkowe	puste
		średni kwadrat	średni kwadrat	średni kwadrat	średni kwadrat
Genotyp	2	183,5	293,0*	616,8*	44,0
Pożywka	1	199,8	41,3	7,0	538,9*
Termin	3	250,9*	16,1	748,6*	114,2
Genotyp*Pożywka	2	157,2	40,4	38,2	214,1
Genotyp* Termin	6	43,1	13,8	34,0	78,6
Pożywka*Termin	3	15,0	38,9	6,8	29,8
Genotyp*Pożywka*Termin	6	30,6	34,3	20,8	32,5
Błąd	24	67,0	35,5	121,8	70,8

*- istotność na poziomie $\alpha=0,05$

Tabela 30. Wartości średnie zmian dla obserwowanych mikrospor trzech genotypów *L. angustifolius* wykorzystanych do indukcji androgenozy

Genotyp	% struktur							
	jedno komórkowe		2-4 komórkowe		wielokomórkowe		puste	
Graf	17,3	a	26,0	a	32,91	ab	23,8	a
Karo	20,0	a	18,6	b	34,85	b	26,6	a
Emir	24,0	a	26,0	a	23,26	a	26,7	a
średnia	20,5		23,5		30,3		25,7	
NIR	n.ist.		16,3		21,8		n.ist.	

a,b,c- grupy jednorodne na podstawie testu Tukeya

Tabela 31. Wartości średnie dla obserwowanych mikrospor trzech genotypów *L. angustifolius* wykorzystanych do indukcji androgenozy na dwóch wariantach podłoży hodowlanych

Pożywka	% struktur							
	jedno komórkowe		2-4 komórkowe		wielokomórkowe		puste	
B5	18,4	a	22,6	a	29,9	a	29,0	b
B5 + BA	22,4	a	24,4	a	30,7	a	22,3	a
średnia	20,5		23,5		30,3		25,7	
NIR	n.ist.		n.ist.		n.ist.		18,5	

a,b,c- grupy jednorodne na podstawie testu Tukeya

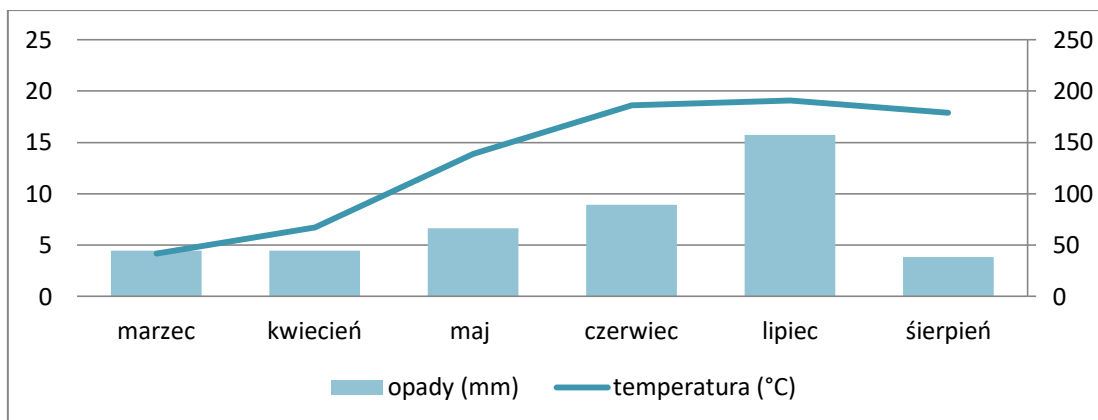
Tabela 32. Wartości średnie dla obserwowanych mikrospor trzech genotypów *L. angustifolius* po 7, 14, 21 i 28 dniach wykorzystanych do indukcji androgenezy

Termin	% struktur							
	jedno komórkowe		2-4 komórkowe		wielokomórkowe		puste	
7	26,7	b	24,0	a	19,2	b	30,1	a
14	20,6	ab	24,6	a	30,4	ab	25,4	a
21	16,2	a	23,7	a	34,8	a	24,2	a
28	18,1	ab	21,9	a	36,9	a	22,9	a
średnie	20,5		23,5		30,3		25,7	
NIR	14,1		n.ist.		26,7		n.ist.	

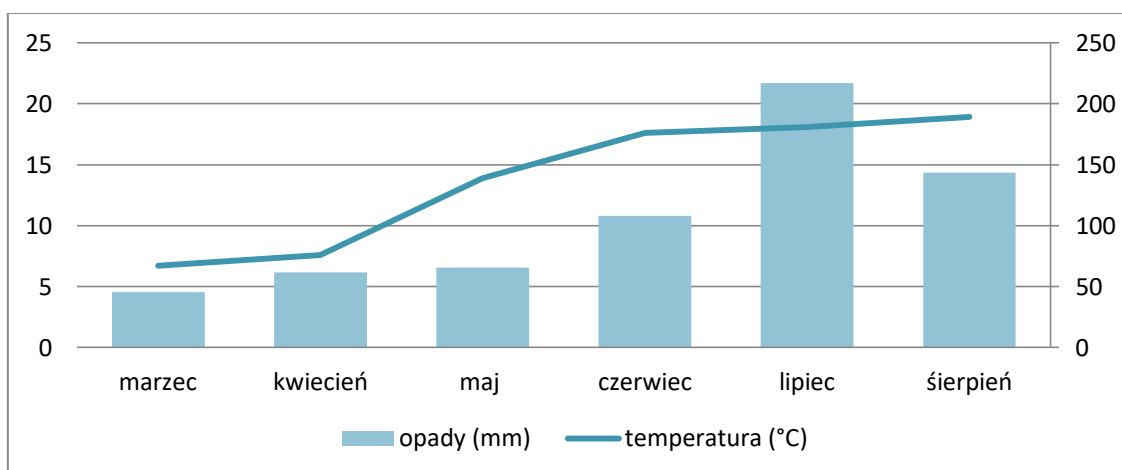
a,b,c- grupy jednorodne na podstawie testu Tukey

XI. Wykresy

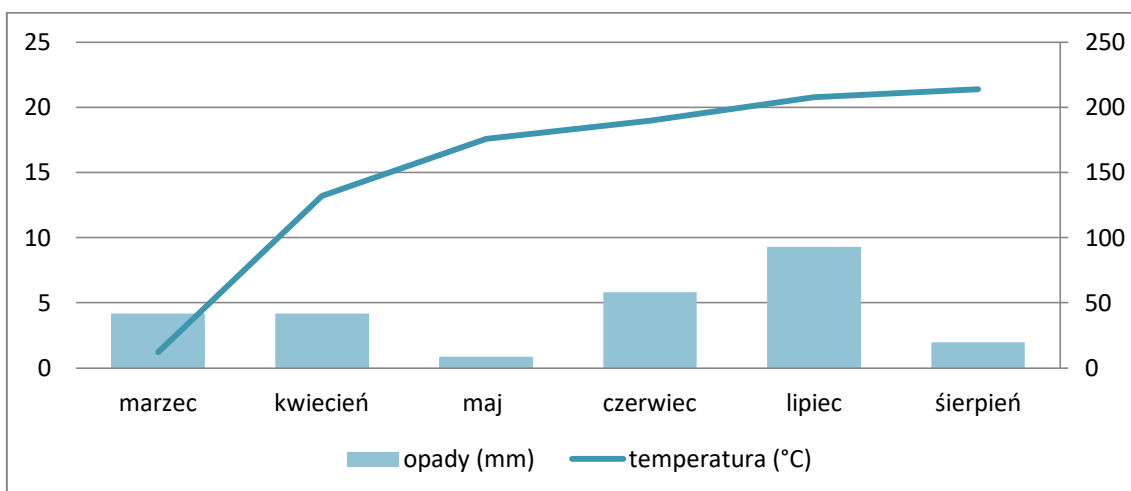
Wykres 1a. Dane metrologiczne ze Stacji Hodowli Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, Oddział Przebędowo w sezonie wegetacyjnym w 2016 r.



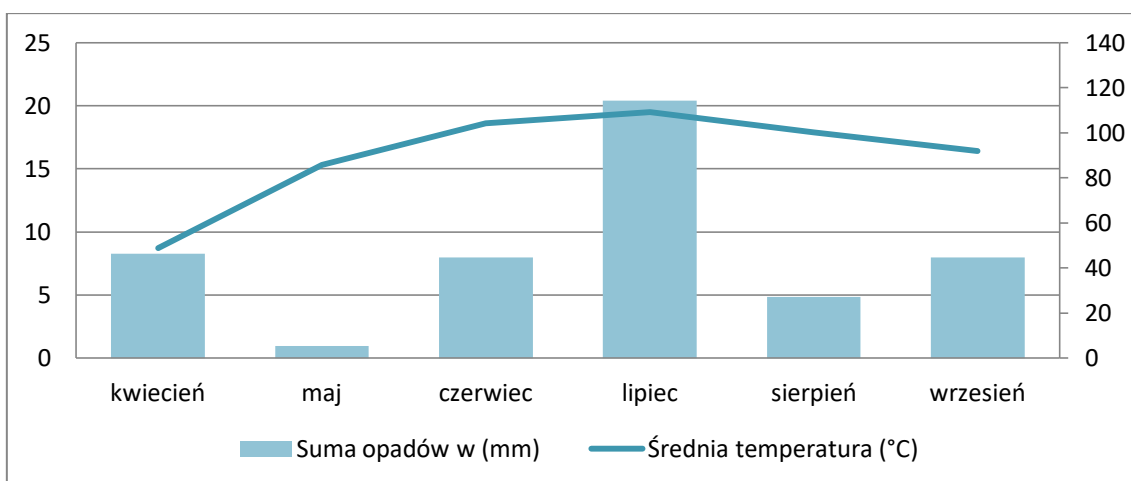
Wykres 1b. Dane metrologiczne ze Stacji Hodowli Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, Oddział Przebędowo w sezonie wegetacyjnym w 2017 r.



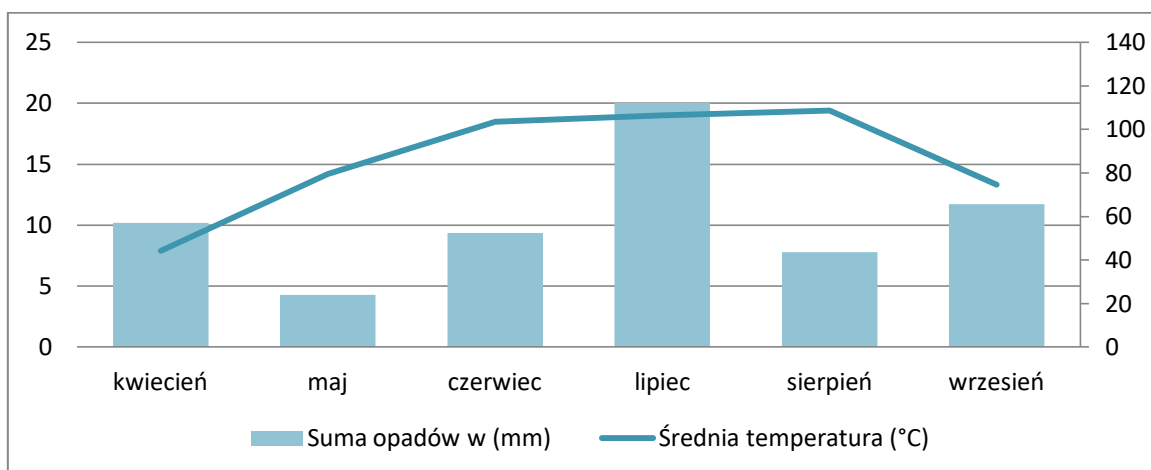
Wykres 1c. Dane metrologiczne ze Stacji Hodowli Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, Oddział Przebędowo w sezonie wegetacyjnym w 2018 r.



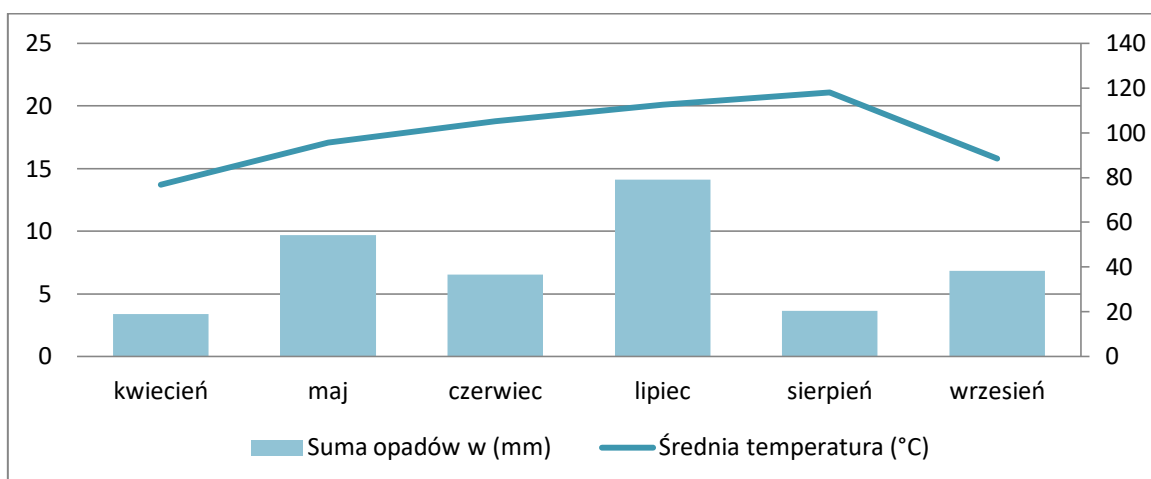
Wykres 2a. Dane metrologiczne ze Rolniczego Zakładu Doświadczalnego Swojec Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w sezonie wegetacyjnym 2016 r.



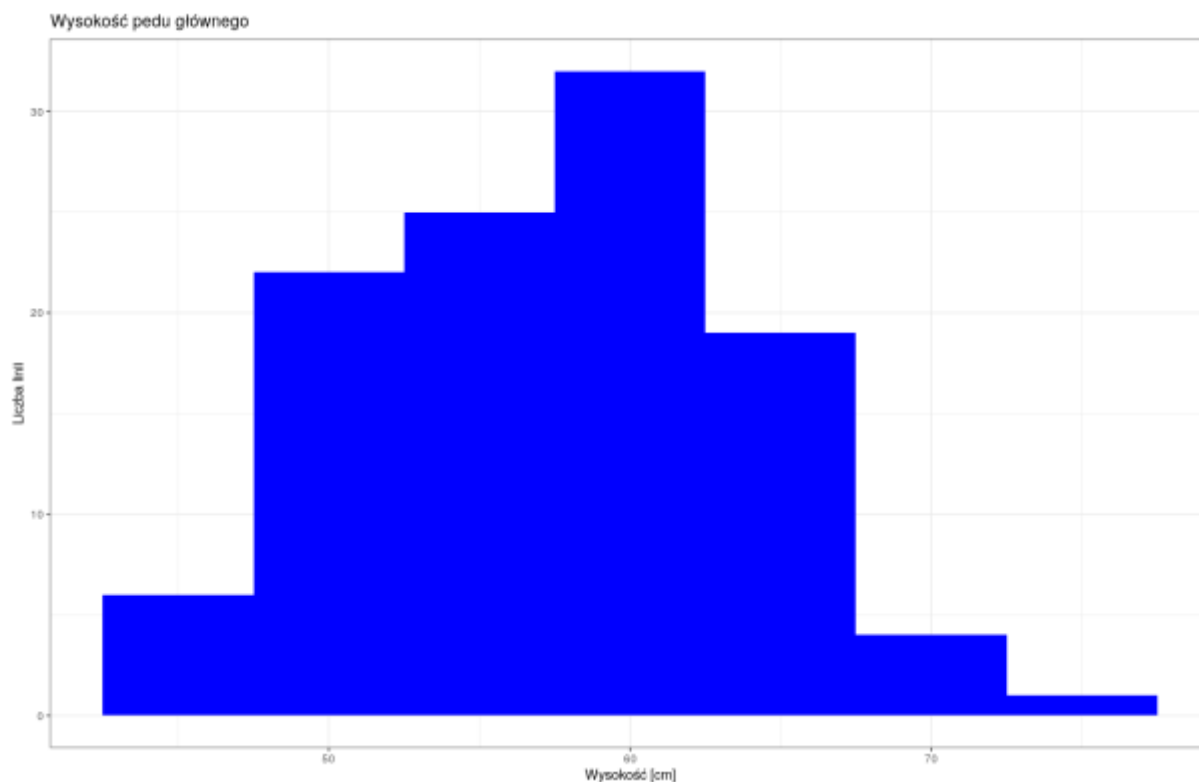
Wykres 2b. Dane metrologiczne ze Rolniczego Zakładu Doświadczalnego Swojec Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w sezonie wegetacyjnym 2017 r.



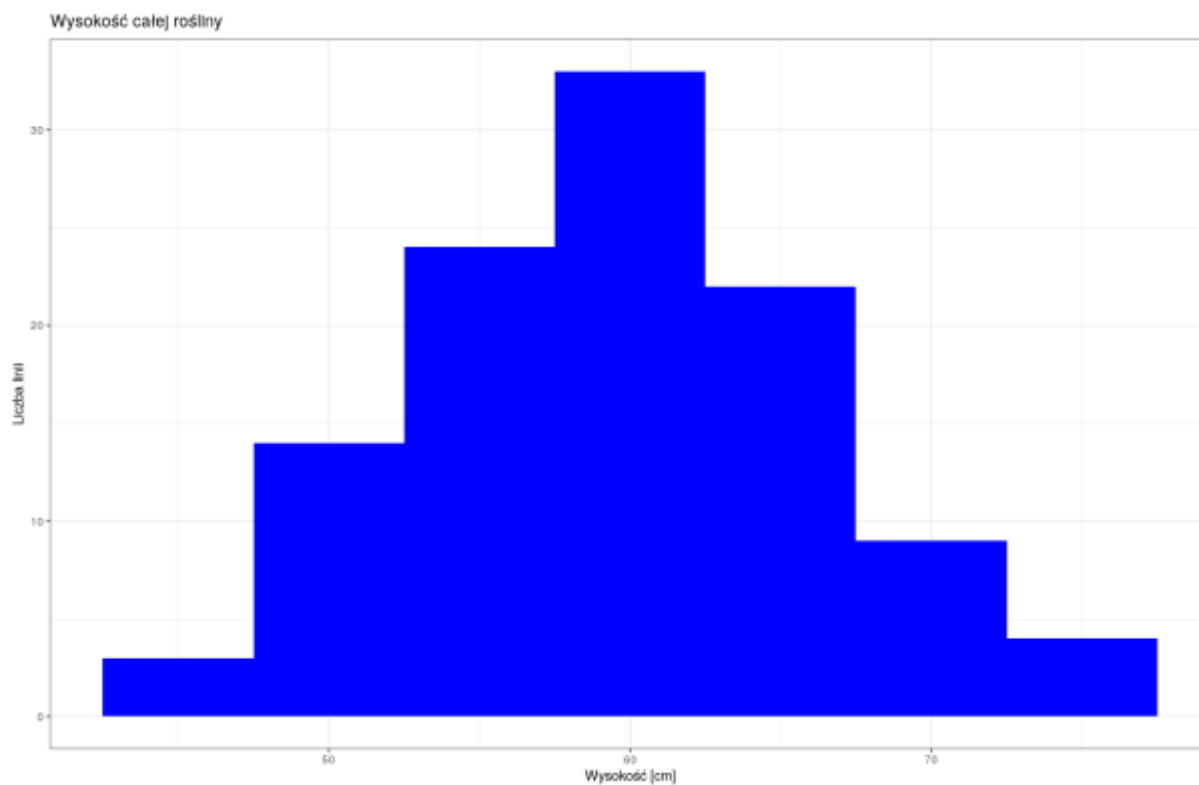
Wykres 2c. Dane metrologiczne ze Rolniczego Zakładu Doświadczalnego Swojec Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w sezonie wegetacyjnym 2018 r.



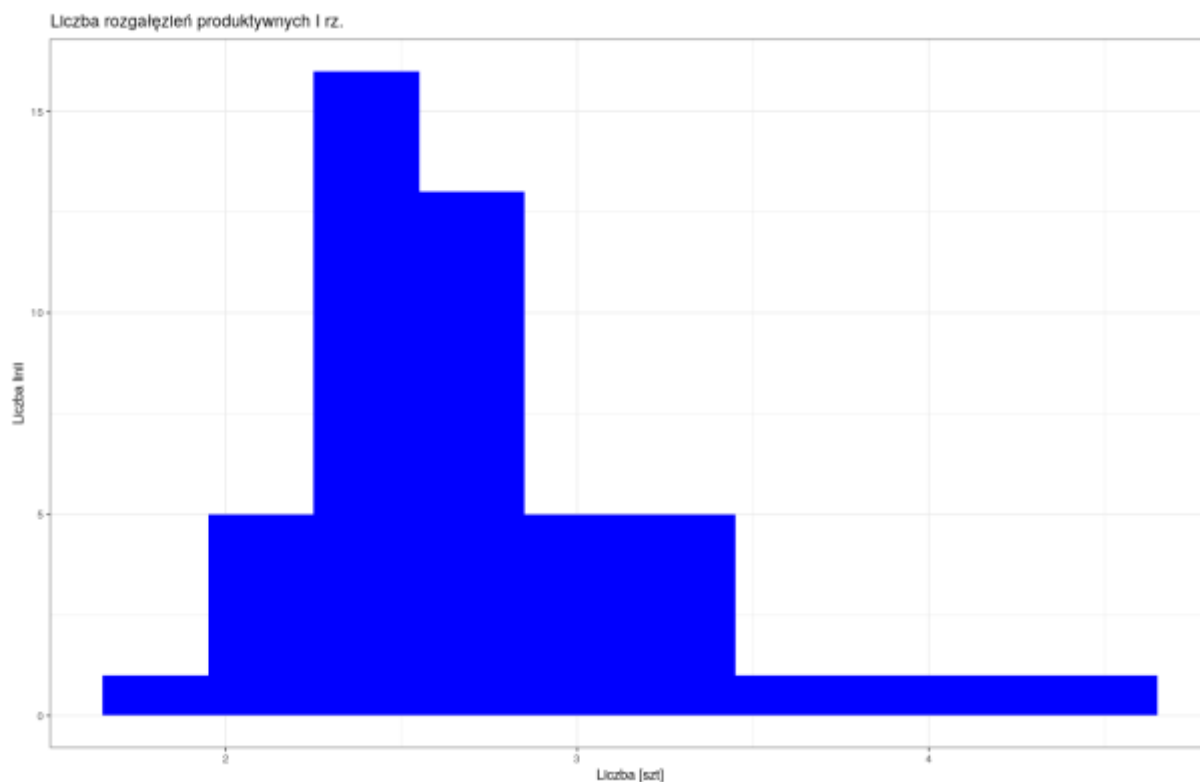
Wykres 3. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla wysokości pędu głównego u analizowanych 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)



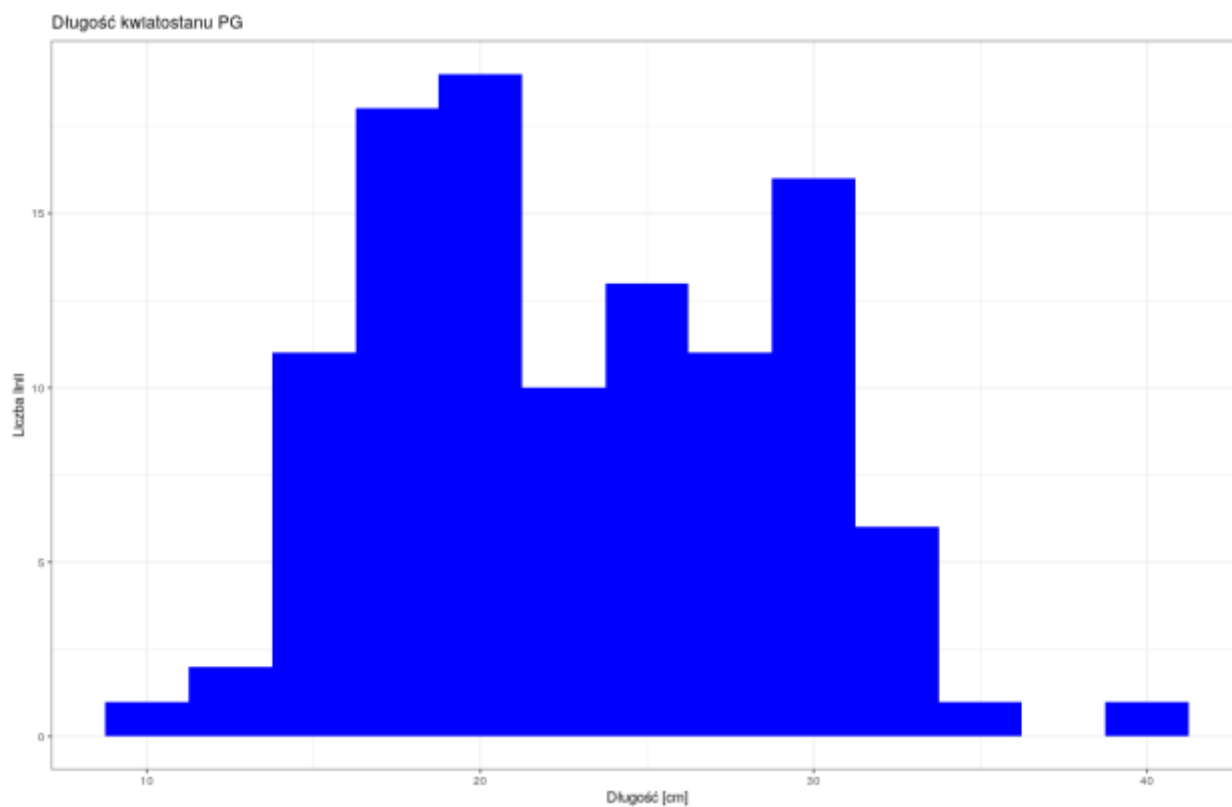
Wykres 4. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla wysokości całej rośliny u analizowanych 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.).



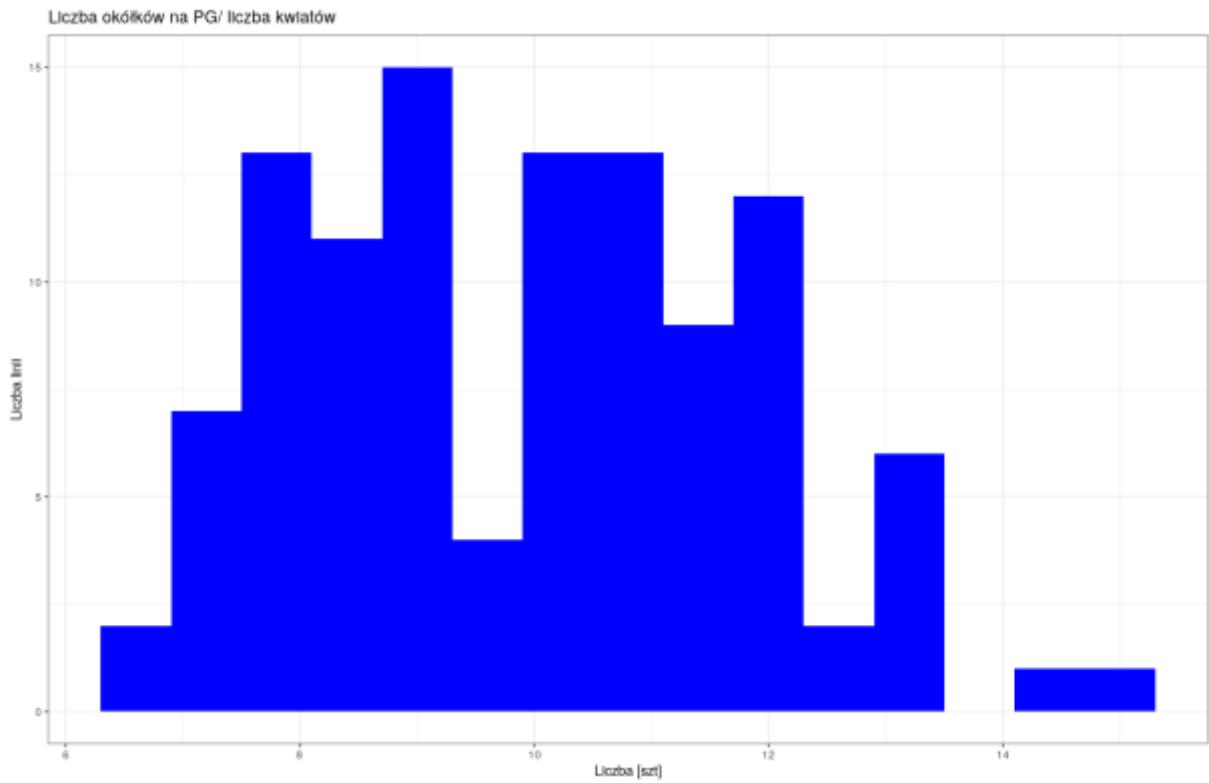
Wykres 5. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla liczby rozgałęzień produktywnych I rzędu u analizowanych 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)



Wykres 6. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla długości kwiatostanów pędu głównego u analizowanych 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)



Wykres 7. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla liczby okółków na pędzie głównym u analizowanych 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.).



Wykres 8. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla liczby zawiązywanych strąków na pędzie głównym u analizowanych 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)

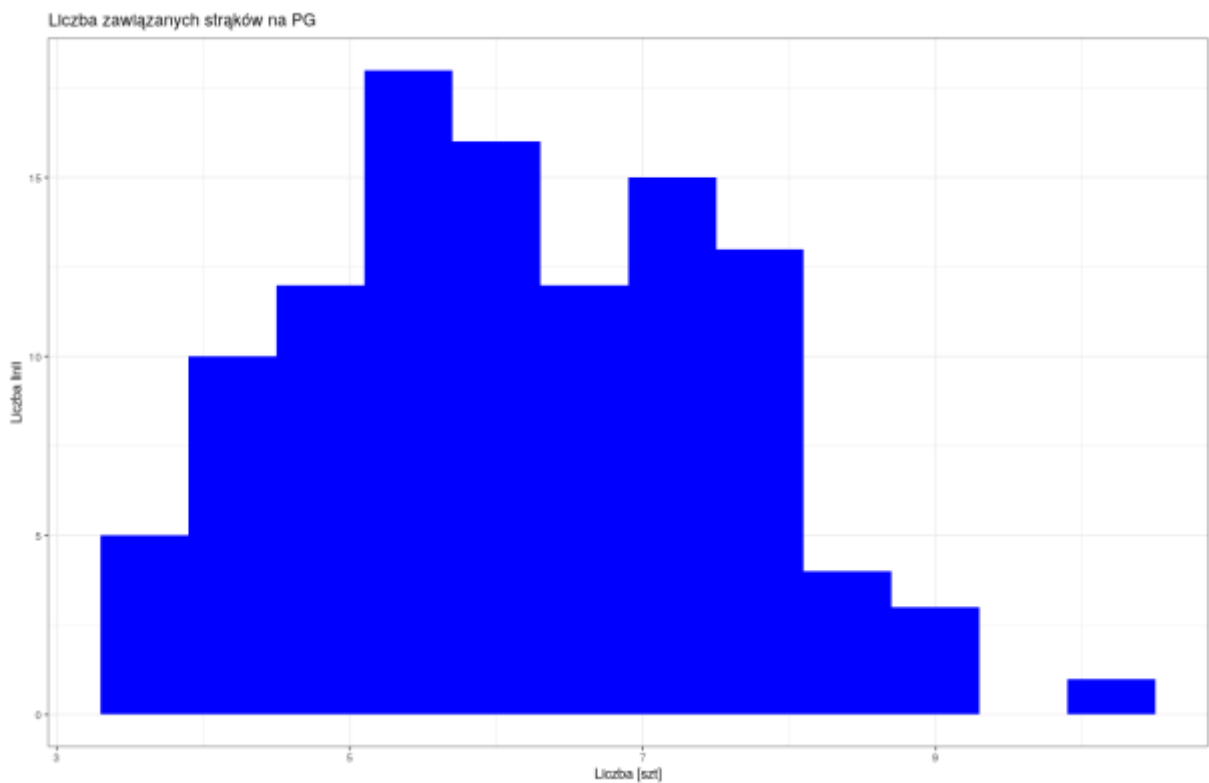
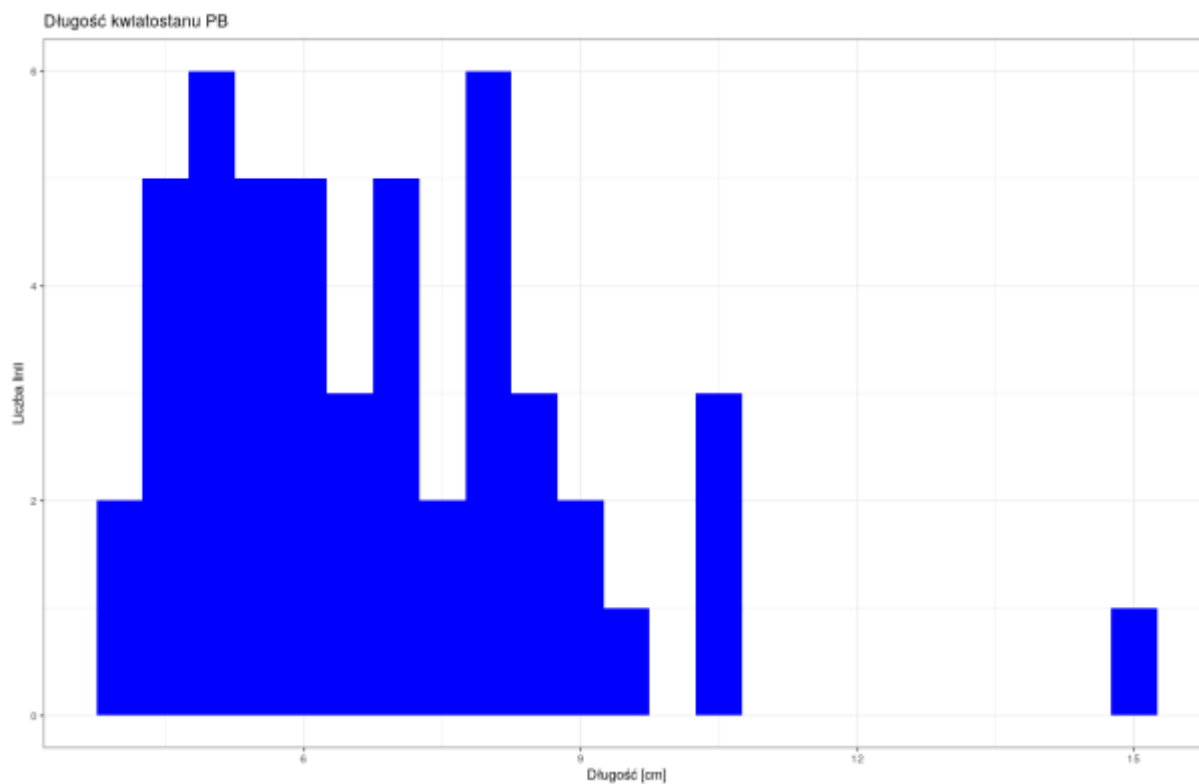
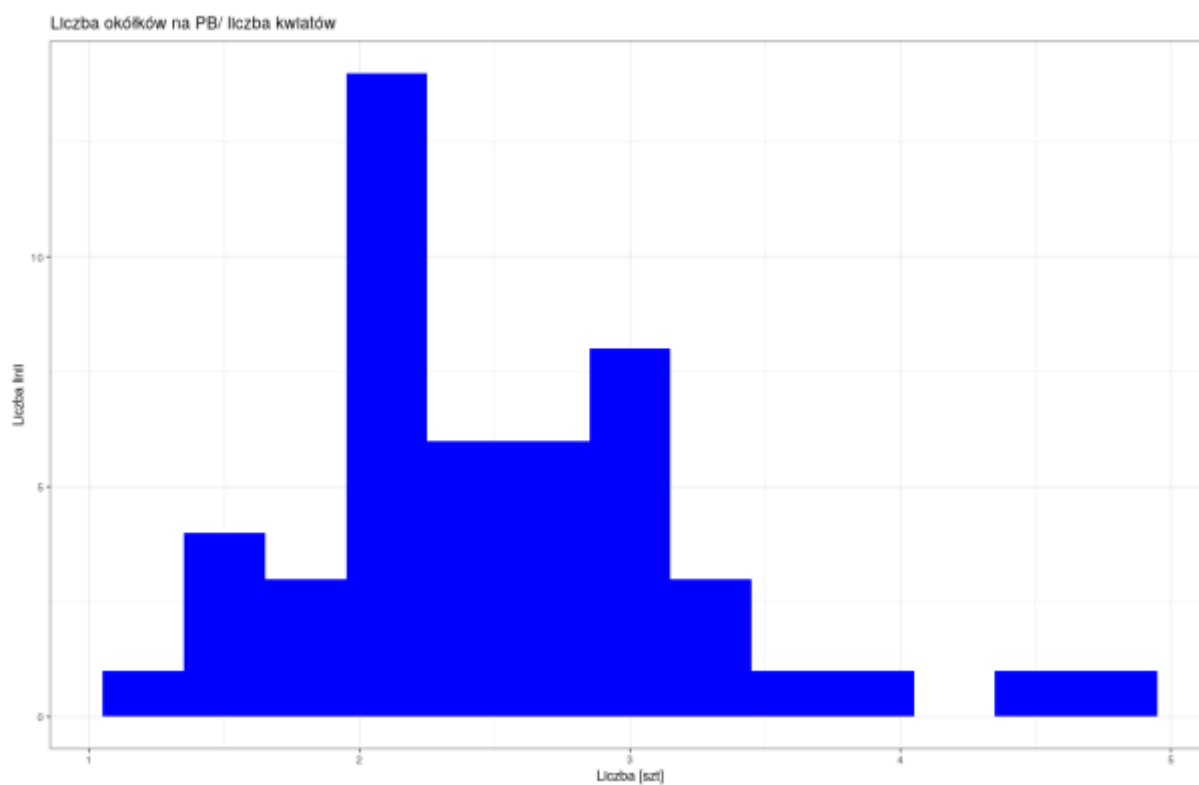


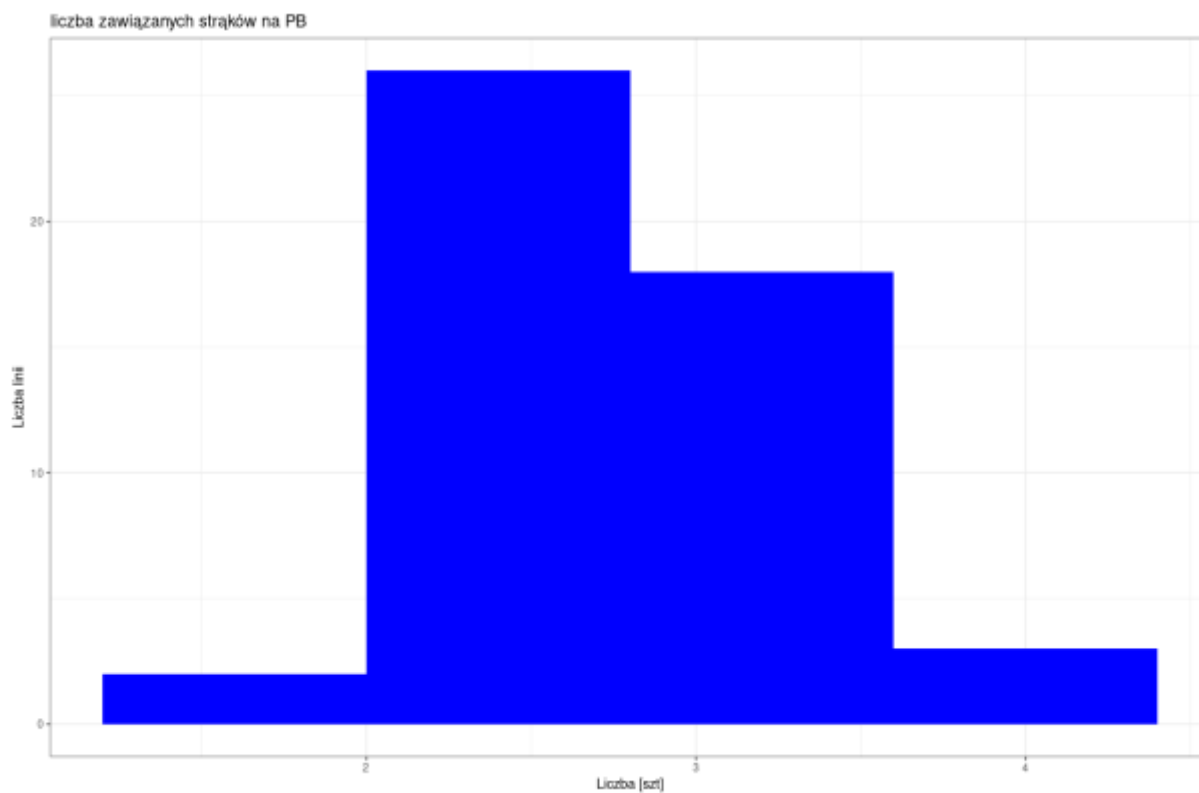
Tabela 9. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla długości kwiatostanów pędu bocznego u analizowanych 108 linii łąbinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)



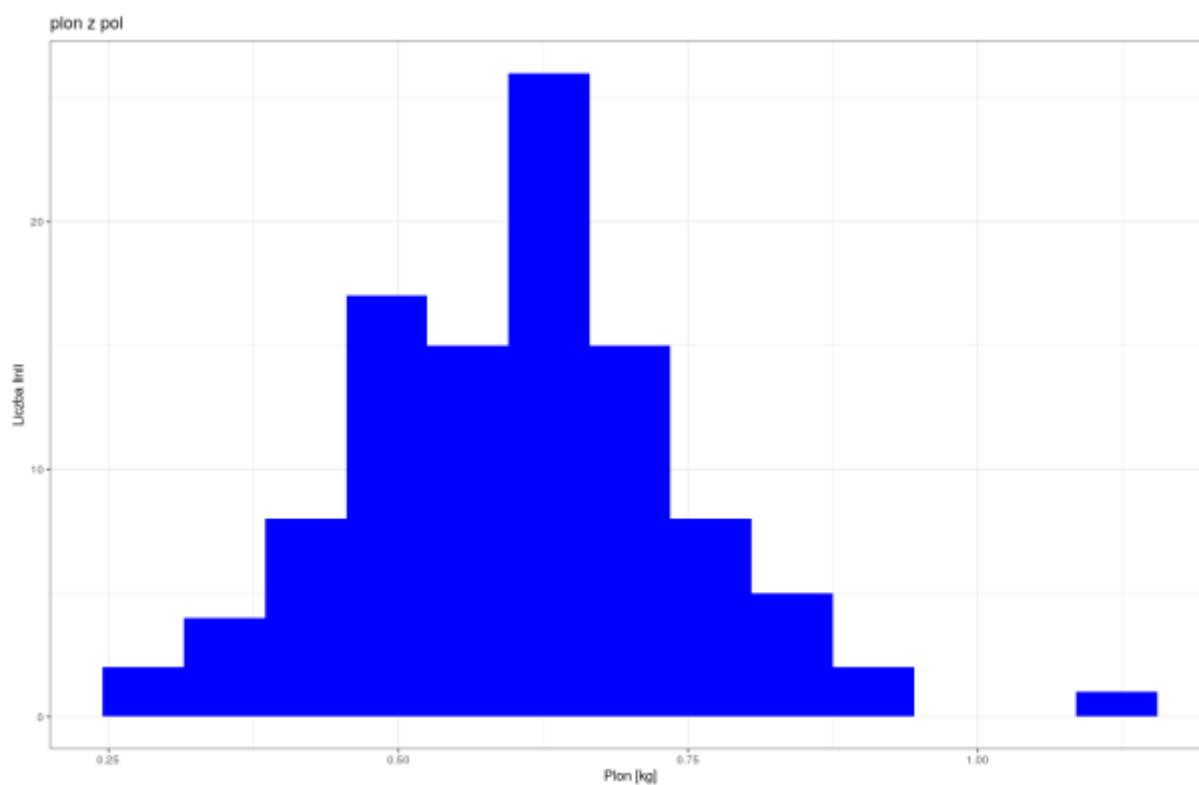
Wykres 10. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla liczby okółków na pędzie bocznym u analizowanych 108 linii łąbinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)



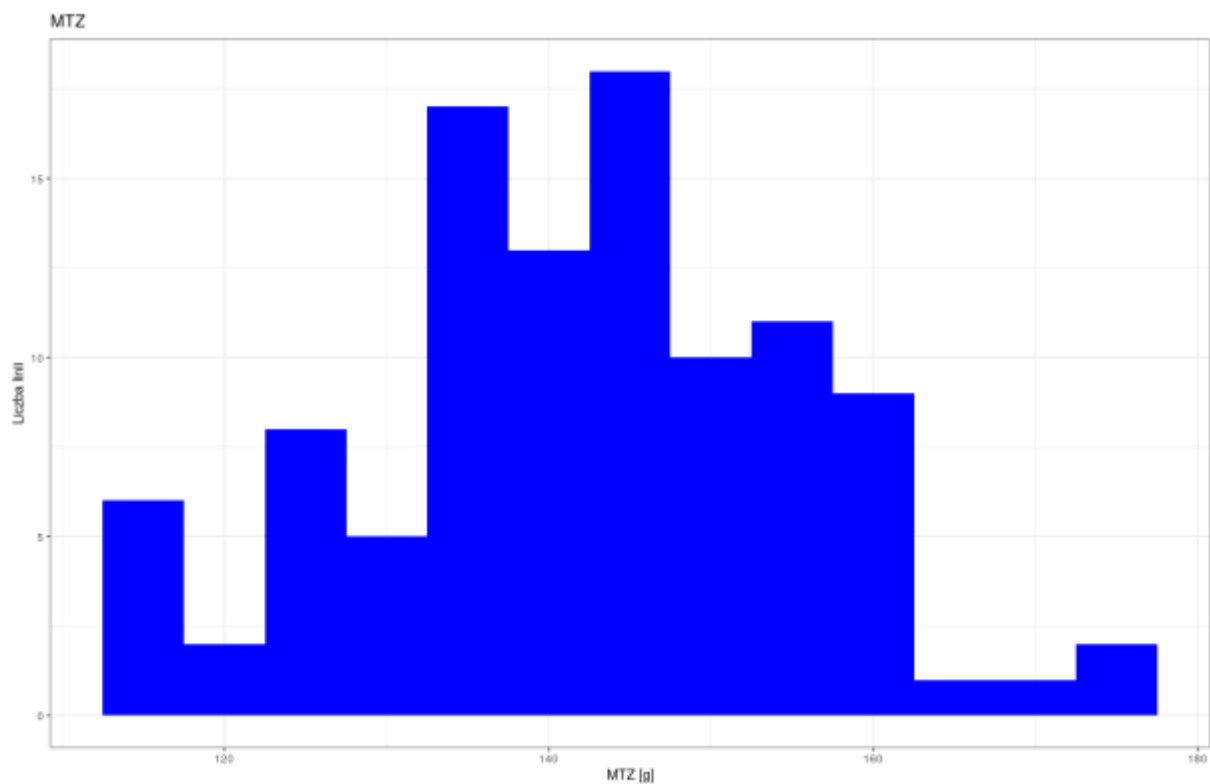
Wykres 11. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla liczby zawiązanych strąków na pędzie bocznym u analizowanych 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)



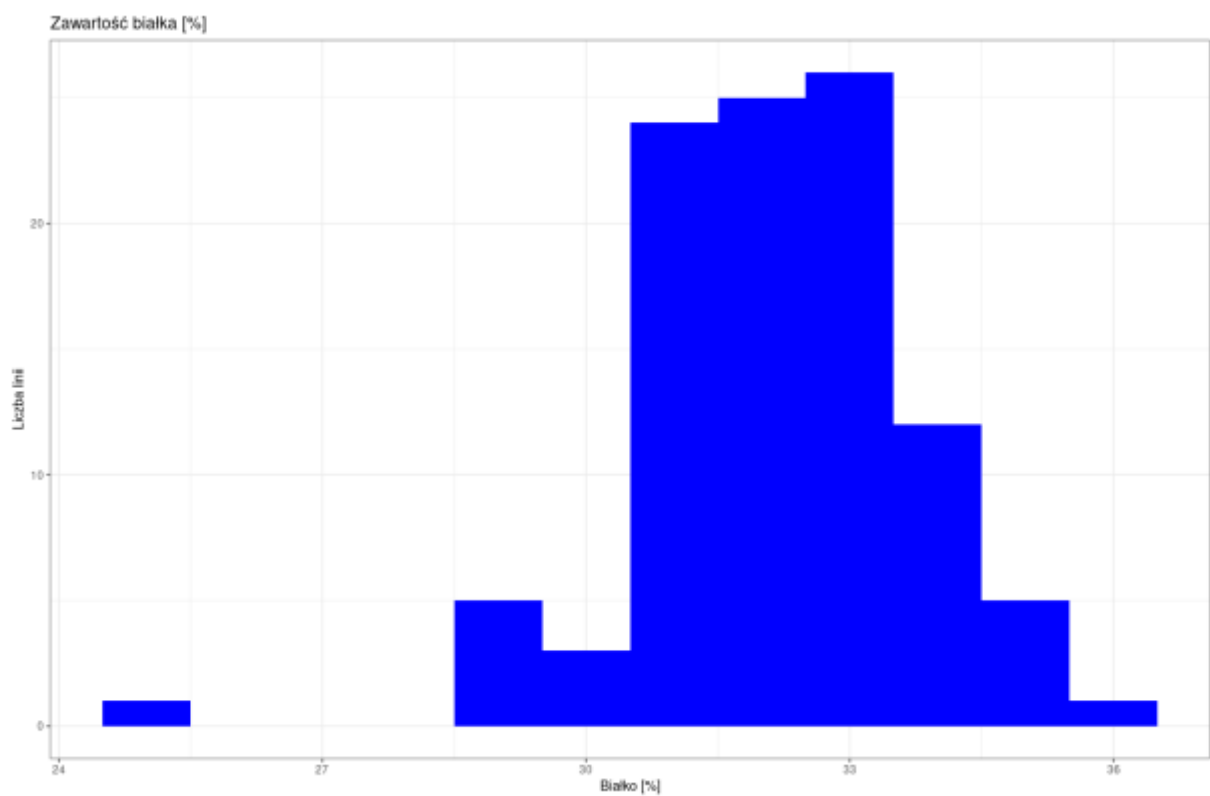
Wykres 12. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla plonu z poletka u analizowanych 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)



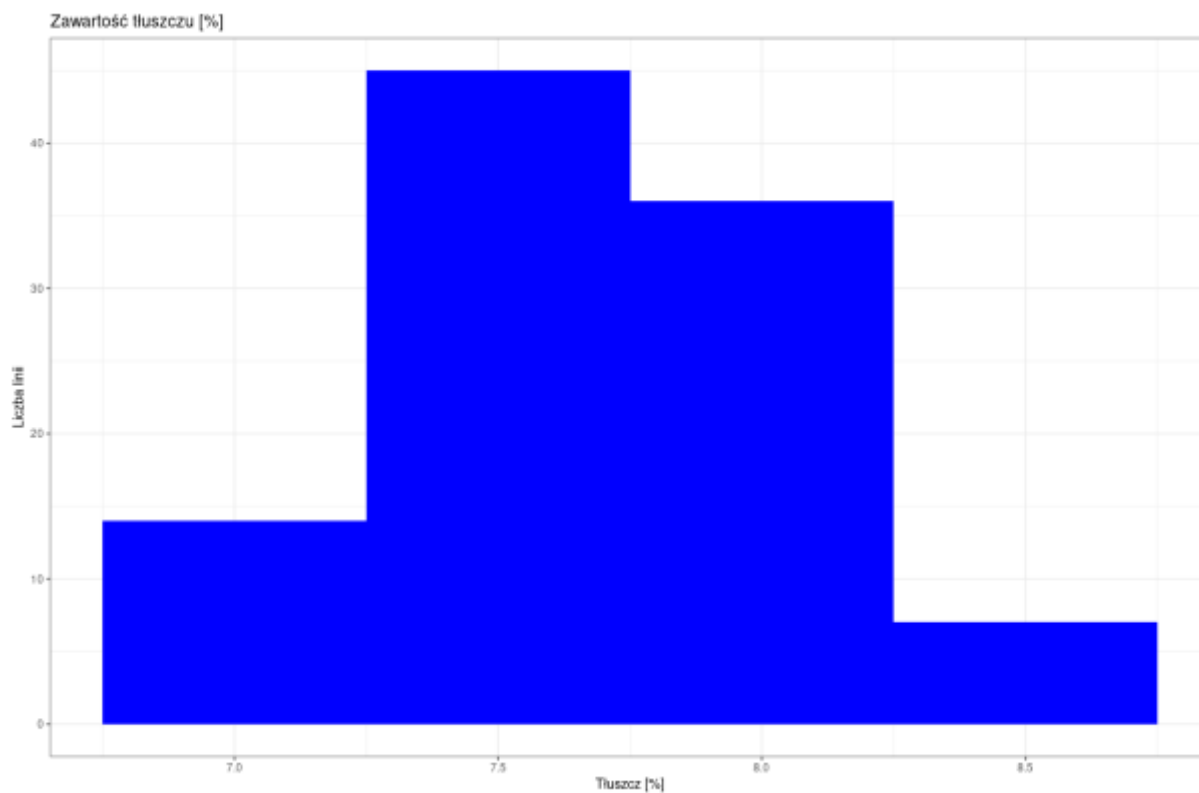
Wykres 13. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla masy tysiąca nasion (MTN) u analizowanych 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)



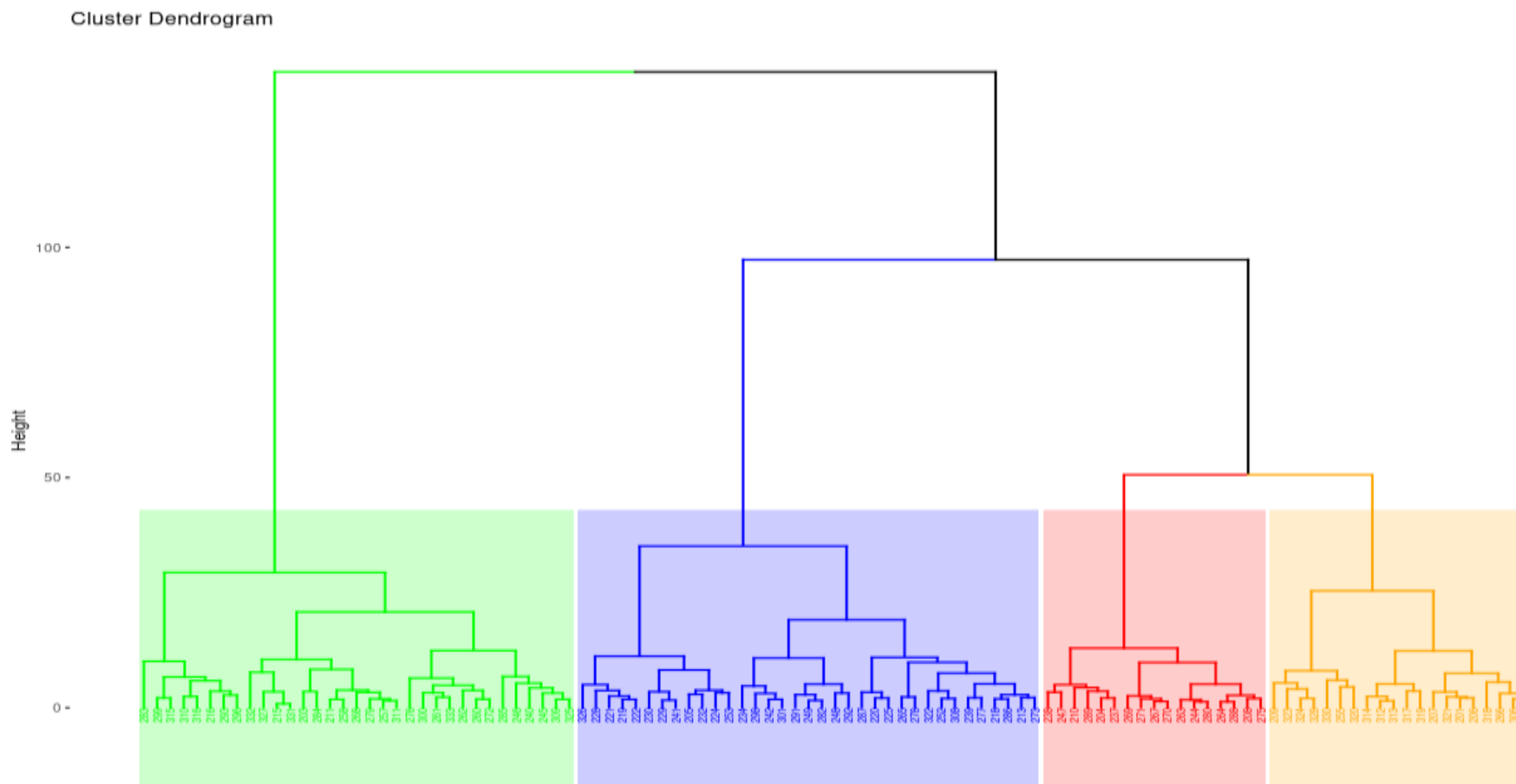
Wykres 14. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla zawartości białka (%) u analizowanych 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius*)



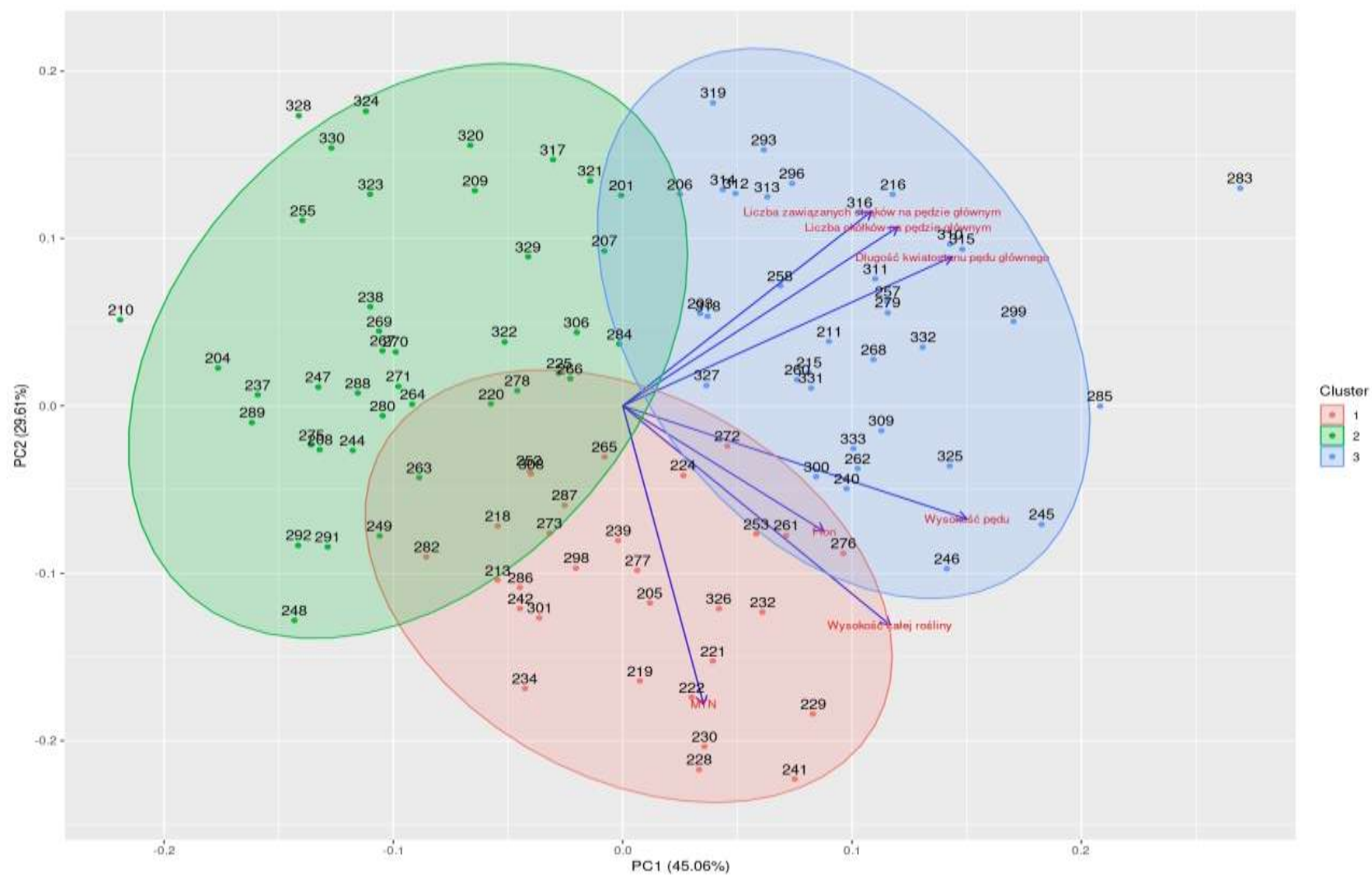
Wykres 15. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla zawartości tłuszczu u analizowanych 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)



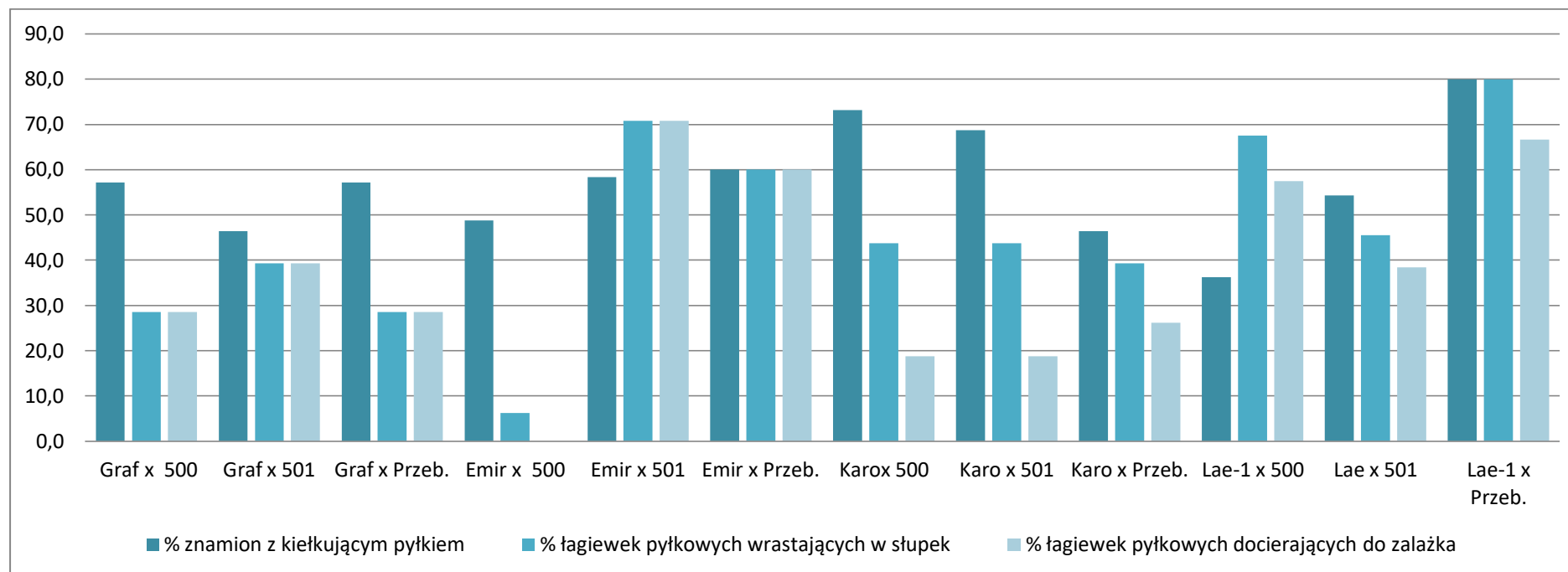
Wykres 16. Dendrogram analizowanych cech morfologicznych i plonu *L. angustifolius* L. z podziałem na klastry



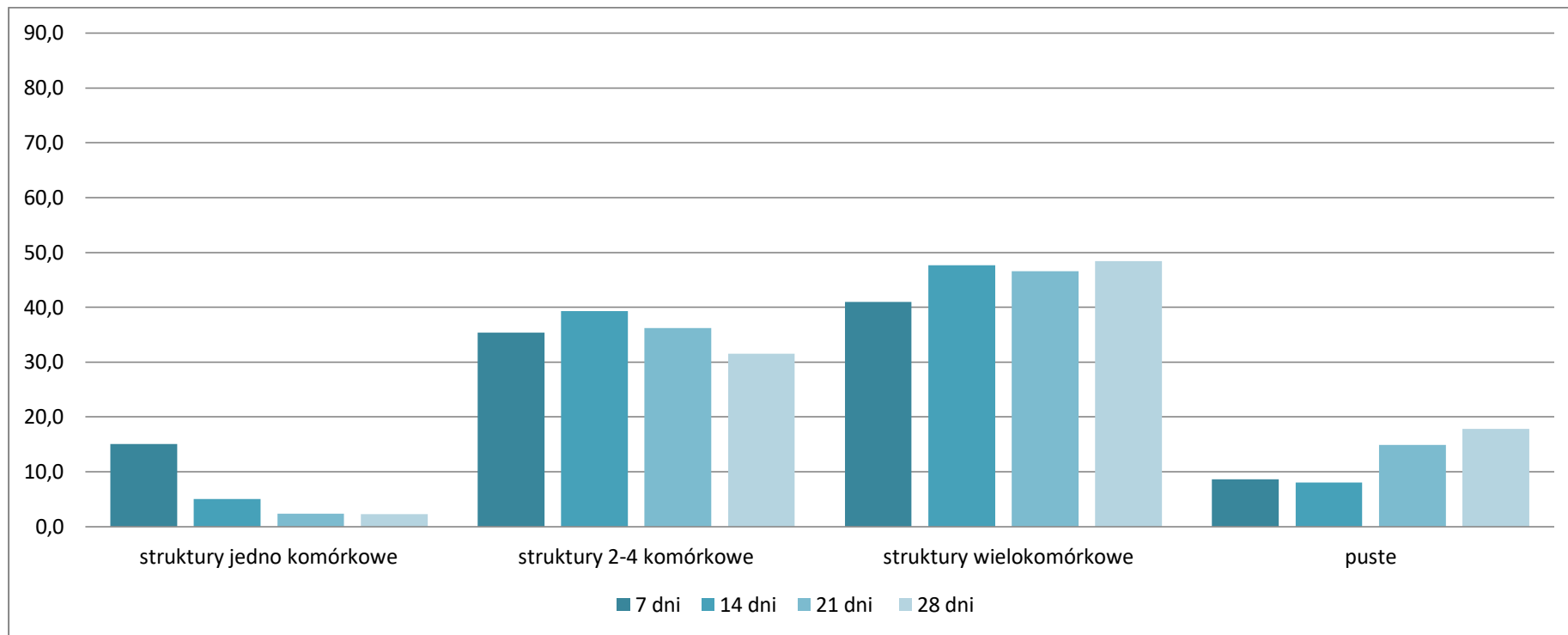
Wykres 17. Analiza składowych głównych 108 linii RILs łubinu wąskolistnego z wyodrębnionymi klastrami dla cech morfologicznych i plonu



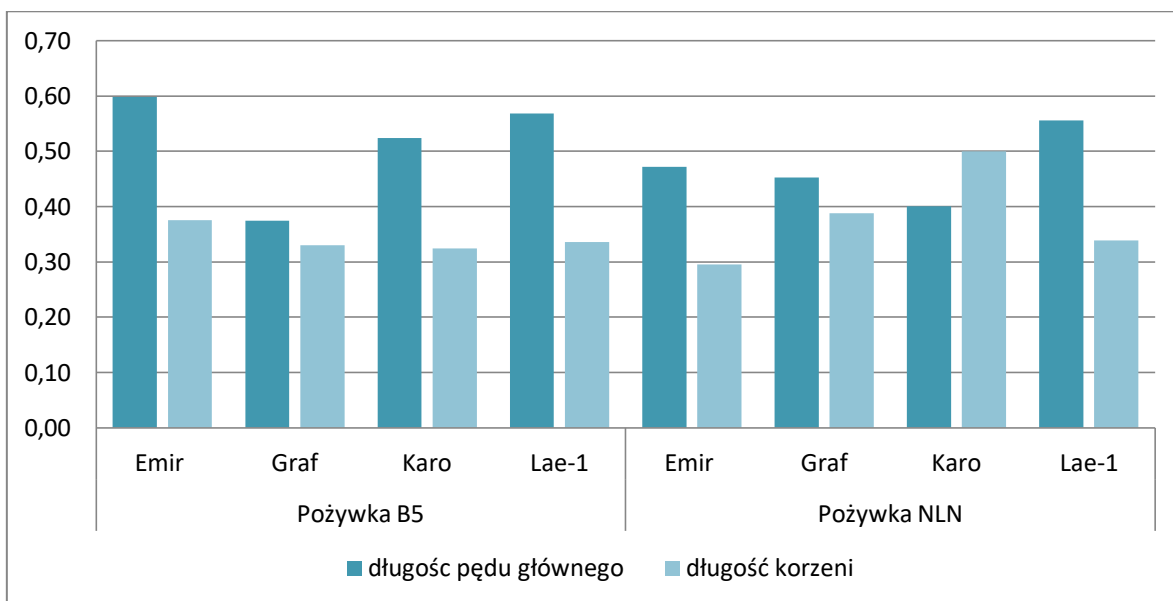
Wykres 18. Zachowanie się pyłku trzech genotypów *L. luteus* (500,501, Przebędowo) na znamionach czterech odmian *L. angustifolius*



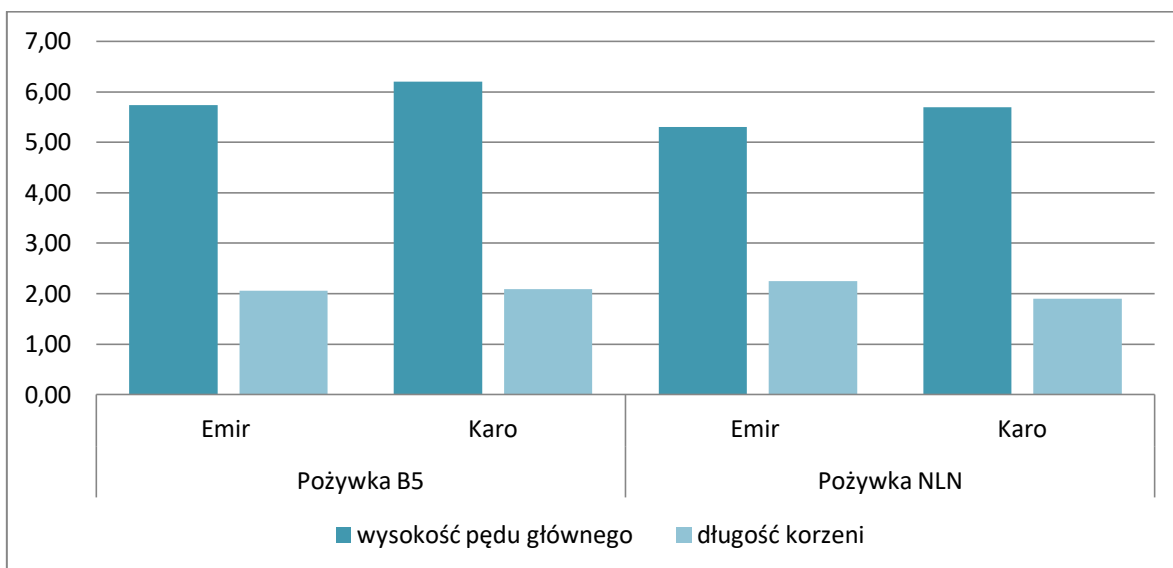
Wykres 19. Analiza zachowania się mikrospor linii Lae-1 na podłożu hodowlanym B5 po 7, 14, 21 i 28 dniach obserwacji



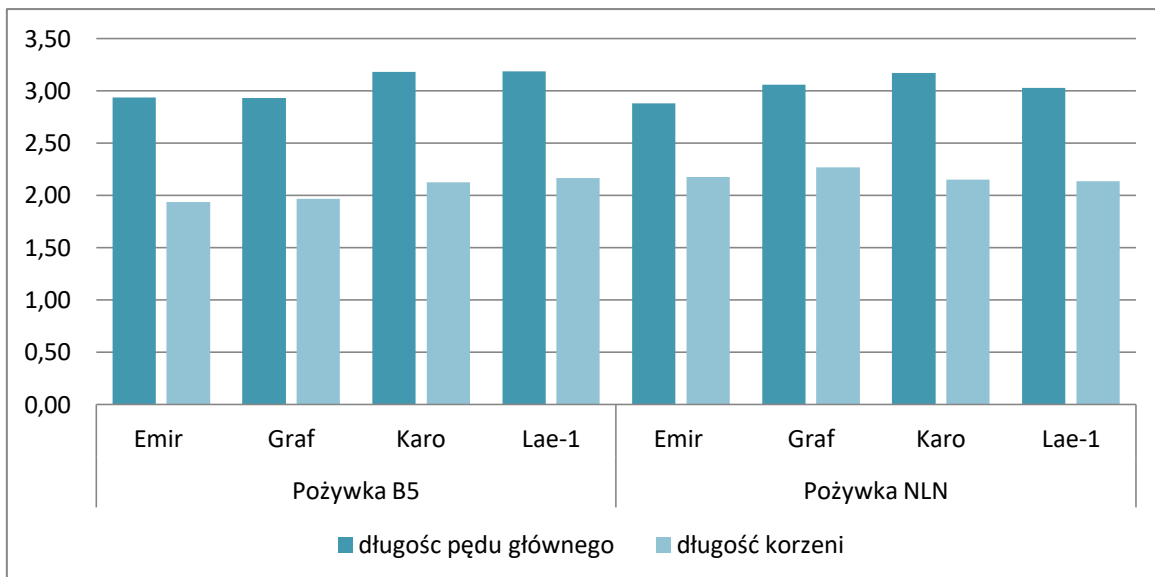
Wykres 20. Analiza osi zarodkowych (stadium A) po 14 dniach od założenia kultury



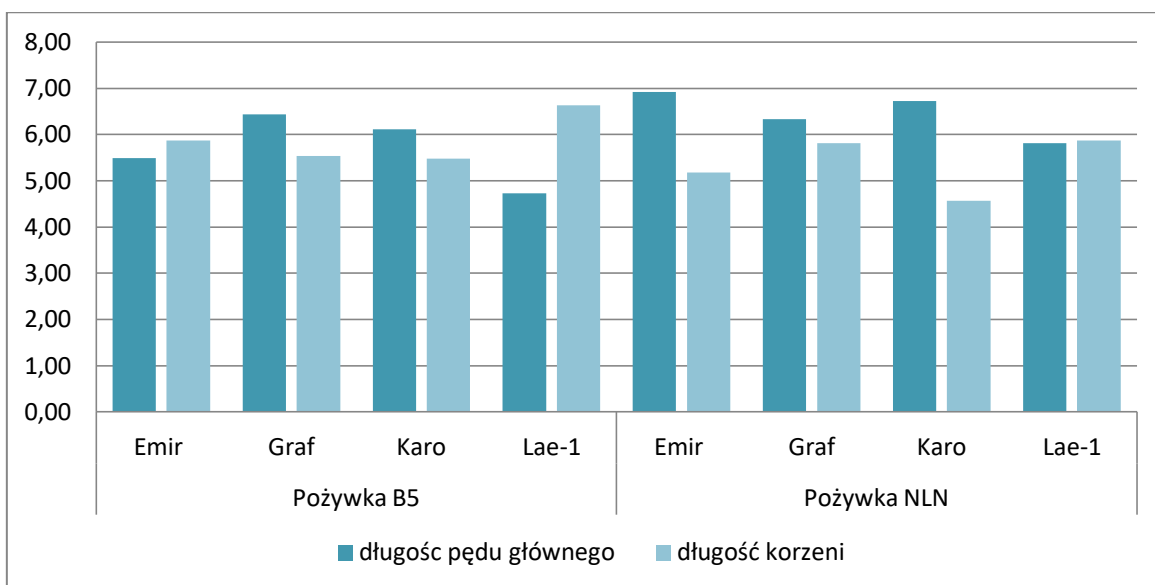
Wykres 21. Analiza wzrostu zarodków (stadium A) po 28 dniach od założenia kultury



Wykres 22. Analiza wzrostu zarodków (stadium B) po 14 dniach od założenia kultury



Wykres 23. Analiza wzrostu zarodków (stadium B) po 28 dniach od założenia kultury



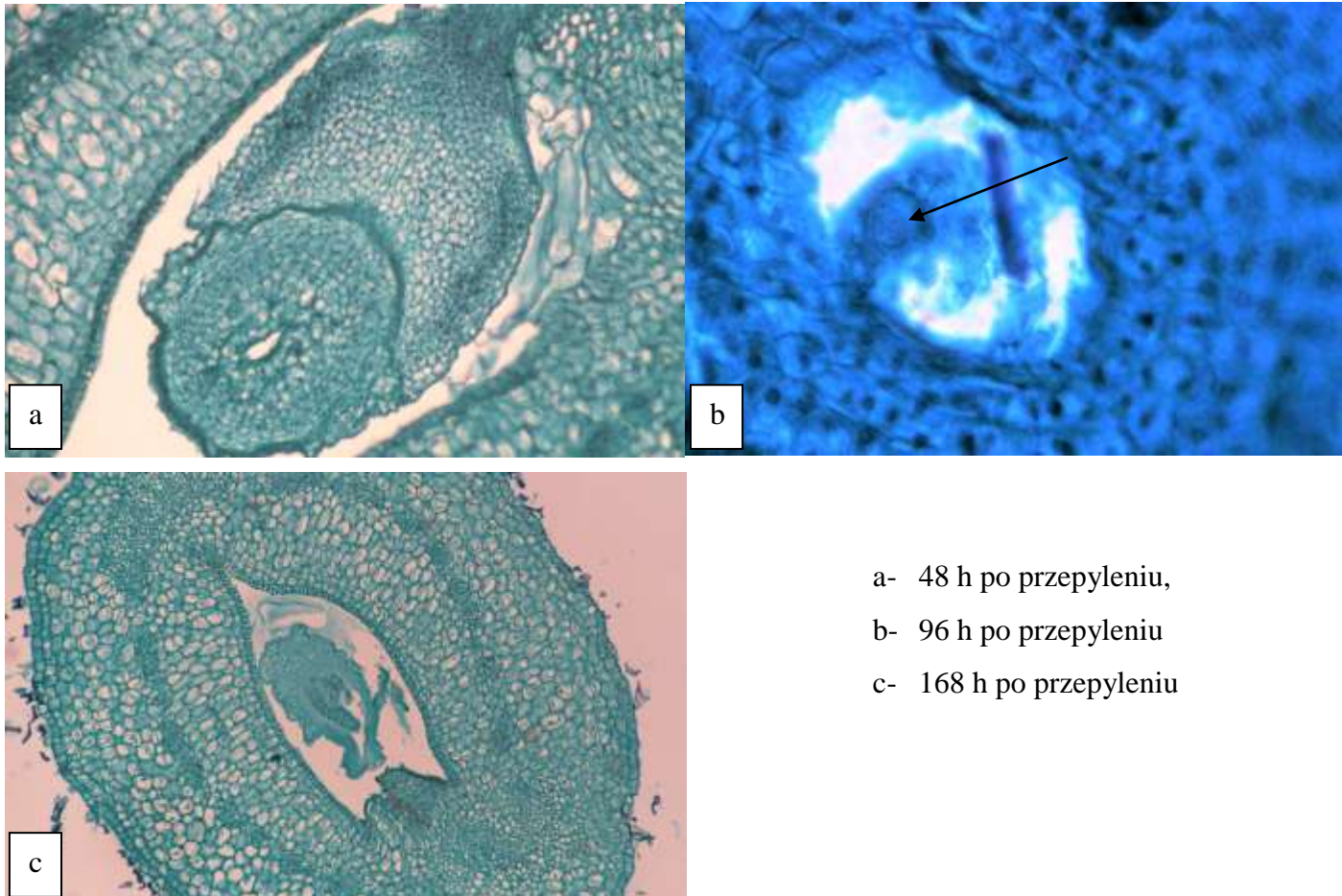
XII. Zdjęcia

Zdjęcie 1. Analiza zachowania się obcego pyłku *L. luteus 501* w słupku łubinie wąskolistnego 'Karo'



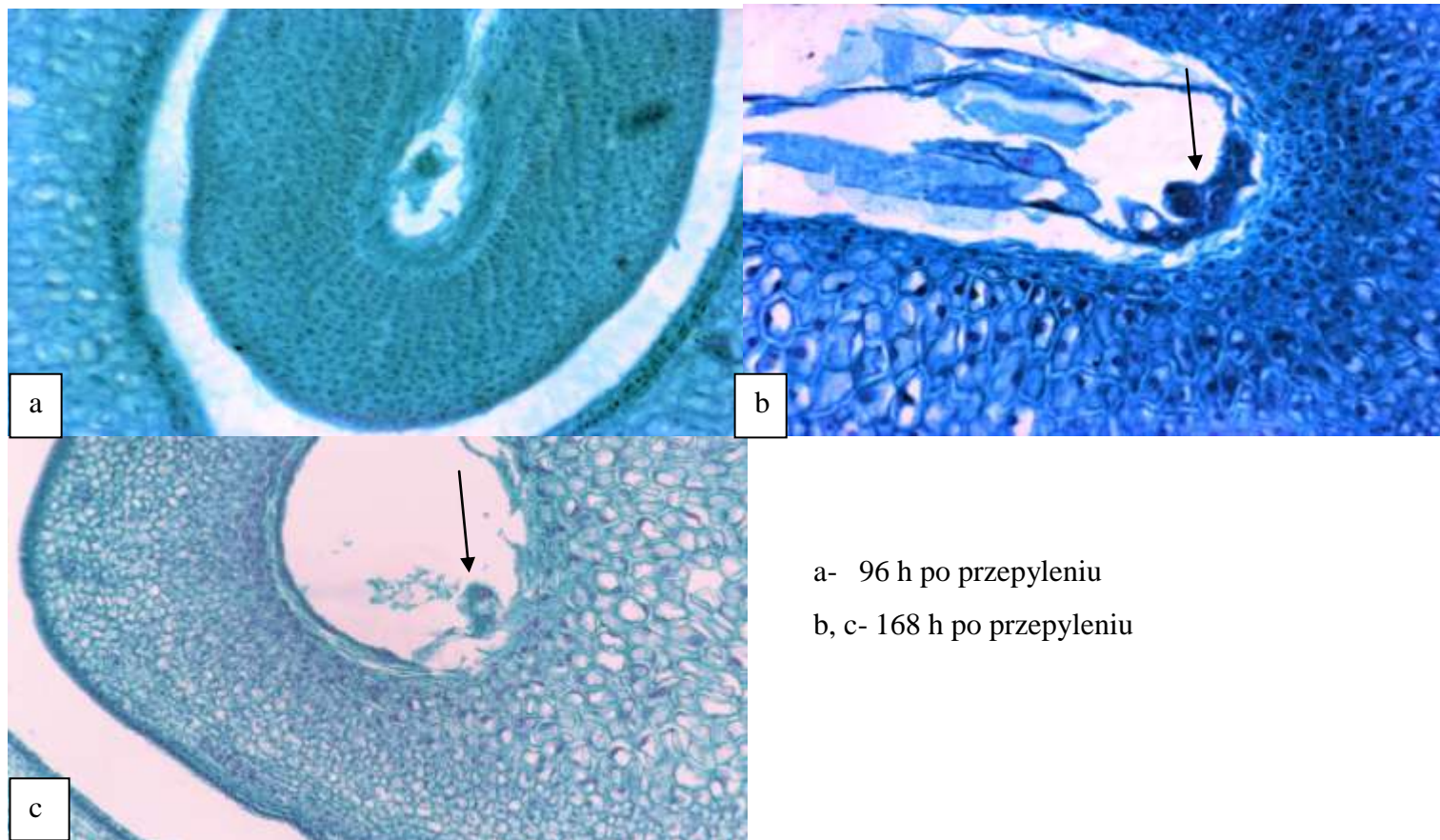
- a- kiełkujący pyłek na znamieniu słupka po 48 h od przepylecia
- b- przerastanie łagiewek przez szyjkę słupka
- c- przerastanie łagiewek pyłkowych przez zalążek

Zdjęcie 2. Rozwój woreczka zalążkowego u *L. angustifolius* 'Karo' po przepyleniu pyłkiem *L. luteus* 500



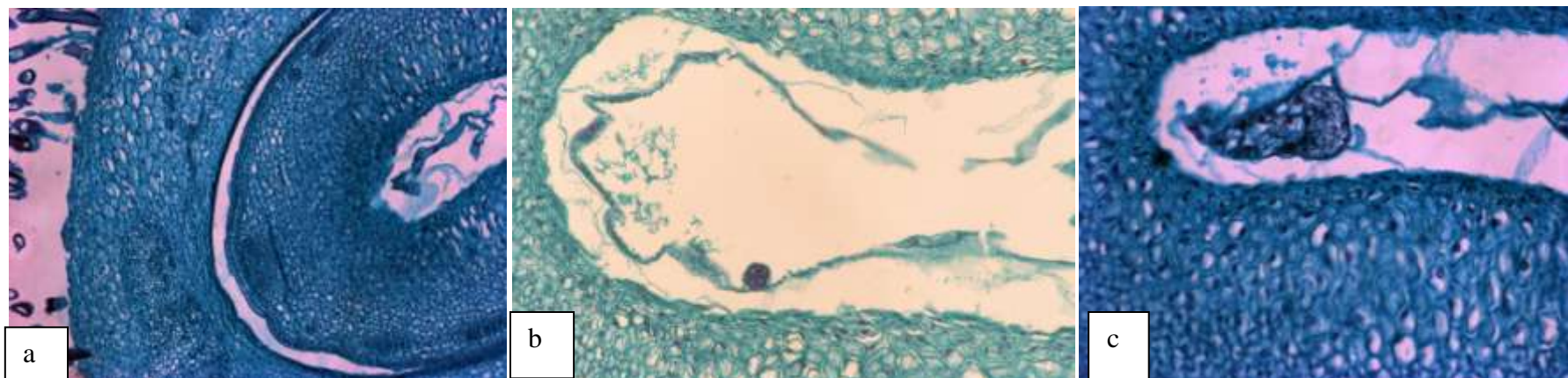
- a- 48 h po przepyleniu,
- b- 96 h po przepyleniu
- c- 168 h po przepyleniu

Zdjęcie 3. Rozwój woreczka zalążkowego u *L. angustifolius* 'Karo' po przepyleniu pyłkiem *L. luteus* 501



a- 96 h po przepyleniu
b, c- 168 h po przepyleniu

Zdjęcie 4. Rozwój woreczka zalążkowego u *L. angustifolius* 'Karo' po przepyleniu pyłkiem *L. luteus* Przebédowo



a- 48 h od przepylenia

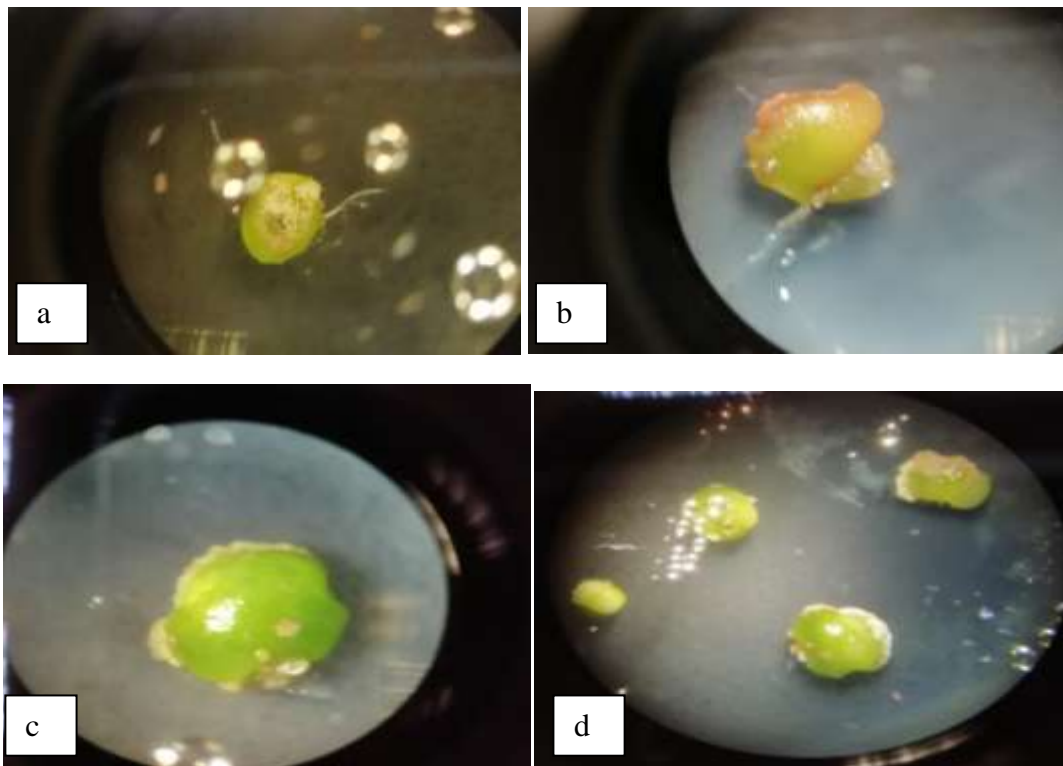
b- 96 h od przepylenia

c- 168 h od przepylenia

Zdjęcie 5. Obserwacja zalążków linii Lae-1 po krzyżowaniu z *L. luteus* 501 na pożywce ML6



Zdjęcie 6. Widoczna tkanka kalusowa po 30 dniach obserwacji na zalążkach uzyskanych po krzyżowaniu *L. langustifolius* z *L. luteus* 500

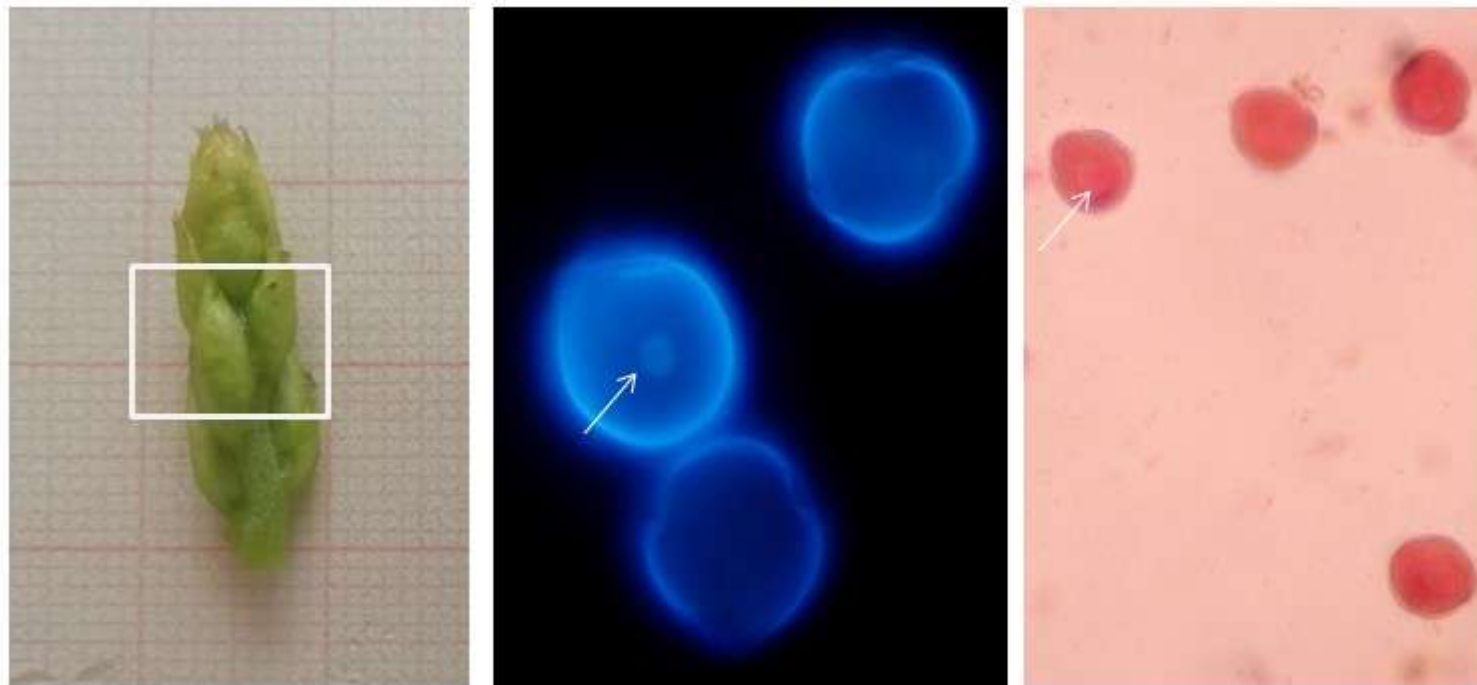


a,b- odmiana Karo
c,d- lini Lae-1

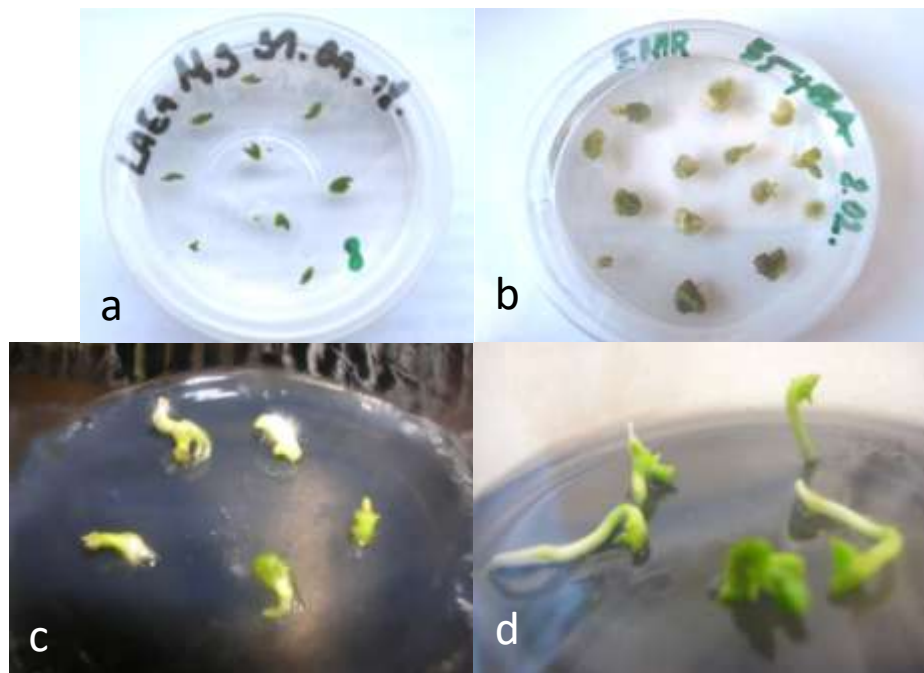
Zdjęcie 7. Pąki czterech genotypów łąbinu wąskolistnego wykorzystane do indukcji androgenezy w kulturach izolowanych mikrospor



Zdjęcie 8. Stadium jednojądrowe w środkowym segmencie pąka odmiany Karo.



Zdjęcie 9. Rozwój zarodków zygocycznych pobranych po 14 dniach od momentu samozapylenia.



a- stadium A – sercowate

b,c i d- dalszy rozwój na pożywce

Zdjęcie 10. Rozwój zarodków zygocycznych pobranych po 28 dniach od samozapylenia.



a- stadium B

b i c- dalszy rozwój na pożywce

Zdjęcie 11. Aklimatyzacja roślin (stadium A i B) w szklarni oraz na polu pod tunelem z agrowłókniną



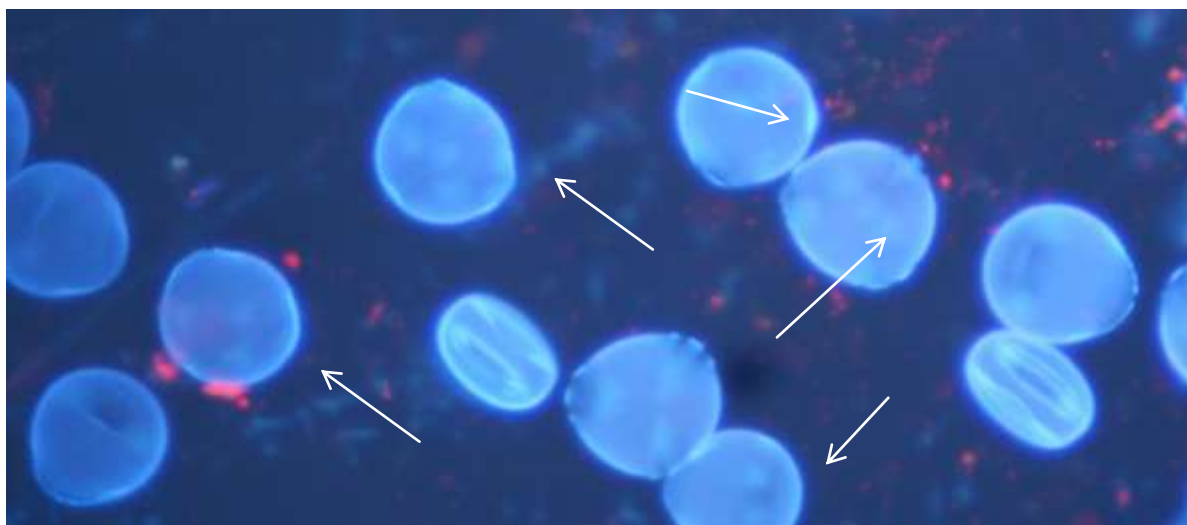
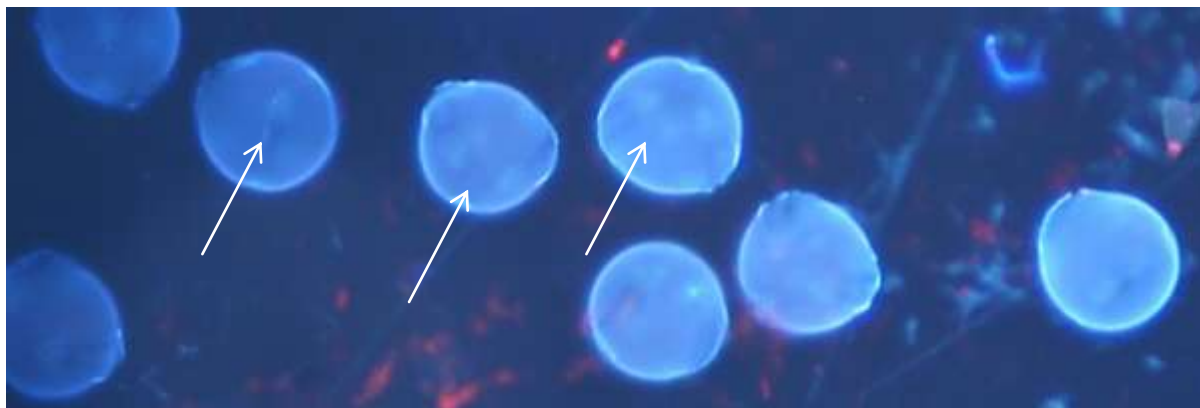
- a- odmiana Karo (stadium A) w szklarni
- b- odmian Karo (stadium B) w warunkach polowych
- c- tunel zabezpieczający rośliny *L. angustifolius* w warunkach polowych

Zdjęcie 12. Odmiana Graf, Emir i Karo (stadium B) po aklimatyzacji w warunkach polowych



- a- odmiana Emir
- b- odmiana Graf
- c- odmian Karo

Zdjęcie 13. Struktury wielokomórkowe linii Lae-1 widoczne pod mikroskopem fluorescencyjnym (autor Renata Galek)



Zdjęcie 14. Poziom ploidalności tkanki kalusowej zalążków pochodzących ze skrzyżowania linii Lae-1x *L.luteus* 500



a- 1x i 2x

b- 1x

XIII. Spis tabel, wykresów i zdjęć

Tabela 1. Zestawienie doświadczeń prowadzonych w rodzaju *Lupinus* w kulturach *in vitro*-mikrorozmnażanie

Tabela 2. Zestawienie badań prowadzonych w rodzaju *Lupinus* dla uzyskania roślin haploidalnych na drodze androgenezy

Tabela 3. Charakterystyka 108 linii RILs pod względem pokroju rośliny, koloru kwiatów oraz barwy nasion

Tabela 4a Dane meteorologiczne ze Stacji Hodowli Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, Oddział Przebędowo – 2016-2018 oraz z wielolecia

Tabela 4b. Dane metrologiczne ze Rolniczego Zakładu Doświadczalnego Swojec Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu- 2016-2018 oraz z wielolecia

Tabela 5. Schemat przepylenia czterech genotypów *L. angustifolius* x *L. luteus*

Tabela 6. Skład pożywki ML6 wg Kumar i in. (1988), NLN wg Nitsch i Nitsch (1969) oraz B5 wg Gamborga (1986)

Tabela 7. Indukcja androgenezy w kulturach izolowanych mikrospor czterech genotypów łubinu wąskolistnego - schemat doświadczenia laboratoryjnego

Tabela 8. Procedura wykonania preparatów trwałych *L. angustifolius* L. wg. Filutowicz i Kuźdowicz (1951)

Tabela 9. Schemat doświadczenia- krzyżowanie oddalone czterech genotypów *Lupinus angustifolius* z trzema liniami induktorów *L. luteus*

Tabela 10. Schemat możliwości uzyskania kilku pokoleń łubinu wąskolistnego w oparciu o metodę pojedynczych nasion (SSD)

Tabela 11. Współczynniki korelacji dla analizowanych cech morfologicznych i plonu łubinu wąskolistnego

Tabela 12. Oddziaływanie środowiska na poszczególne cechy morfologiczne i plon 108 linii RILs

Tabela 13. Zestawienie średnich wartości cech morfologicznych dla 108 linii RILs łubinu w latach 2016 – 2018

Tabela 14a. Zestawienie średnich wartości struktury plonu dla 108 linii RILs łubinu wąskolistnego w latach 2016– 2018

Tabela 14b. Zestawienie średnich wartości białka i tłuszczu dla 108 linii RILs łubinu wąskolistnego w latach 2016– 2018

Tabela 15a. Podział 108 linii RILs łubinu wąskolistnego za pomocą dendrogramu- Klaster A

Tabela 15b. Podział 108 linii RILs łubinu wąskolistnego za pomocą dendrogramu - Klaster B

Tabela 15c. Podział 108 linii RILs łubinu wąskolistnego za pomocą dendrogramu- Klaster C

Tabela 15d. Podział 108 linii RILs łubinu wąskolistnego za pomocą dendrogramu- Klaster D

Tabela 16. Zestawienie składowych głównych i ich udział w zmienności badanej populacji

Tabela 17. Udział analiza cech morfologicznych i plonu w składowych głównych

Tabela 18a. Analiza składowych głównych (PCA) 108 linii RILs łubinu wąskolistnego- Klaster A

Tabela 18b. Analiza składowych głównych (PCA) 108 linii RILs łubinu wąskolistnego- Klaster B

Tabela 18c. Analiza składowych głównych (PCA) 108 linii RILs łubinu wąskolistnego- Klaster C

Tabela 19. Procentowy udział znamion z osadzonym pyłkiem linii induktora *L. luteus* 500,501,Przebędowo oraz intensywność jego osadzania się na znamionach czterech genotypów *L. angustifolius* L.- ‘Emir’, ‘Graf’, ‘Karo’ i Lae-1

Tabela 20. Obserwacje woreczka zalążkowego na preparatach trwałych odmiany Karo po przepyleniu induktorem *L. luteus*

Tabela 21. Wartości średnich kwadratów dla obserwowanych zalążków czterech genotypów *L. angustifolius* po zastosowaniu trzech linii induktorów *L. luteus* po 7, 14, 21 i 30 dniach prowadzenia kultury *in vitro*

Tabela 22. Wartości średnie dla obserwowanych zalążków czterech genotypów *L. angustifolius* po 7, 14, 21 i 30 dniach prowadzenia kultury

Tabela 23. Wartości średnie dla obserwowanych zalążków czterech genotypów *L. angustifolius* po 7, 14, 21 i 30 dniach uzyskanych przy zastosowaniu trzech linii induktorów *L. luteus*

Tabela 24. Wartości średnie dla obserwowanych zalążków czterech genotypów *L. angustifolius* po 7, 14, 21 i 30 dniach prowadzenia kultury na trzech podłożach hodowlanych

Tabela 25. Wartości średnie dla obserwowanych zalążków czterech genotypów *L. angustifolius* po zastosowaniu trzech linii induktora *L. luteus* po 7, 14, 21 i 30 dniach prowadzenia kultury

Tabela 26. Wartości średnie dla obserwowanych zalążków czterech genotypów *L. angustifolius* po 7, 14, 21 i 30 dniach na trzech podłożach hodowlanych

Tabela 27. Wartości średnie dla obserwowanych zalążków po 7, 14, 21 i 30 dniach po zastosowaniu trzech linii induktora *L. luteus* na trzech podłożach hodowlanych

Tabela 28. Wartości średnie dla obserwowanych załączków czterech genotypów *L. angustifolius* po zastosowaniu trzech linii induktora *L. luteus* na trzech podłożach hodowlanych po 7, 14, 21 i 30 dniach prowadzenia kultury

Tabela 29. Średnia kwadranty z trójczynnikiemowej analizy wariancji dla genotypów *L. angustifolius* L. wykorzystanych do indukcji androgenezy

Tabela 30. Wartości średnie zmian dla obserwowanych mikrospor trzech genotypów *L. angustifolius* wykorzystanych do indukcji androgenezy

Tabela 31. Wartości średnie dla obserwowanych mikrospor trzech genotypów *L. angustifolius* wykorzystanych do indukcji androgenezy na dwóch wariantach podłoży hodowlanych

Tabela 32. Wartości średnie dla obserwowanych mikrospor trzech genotypów *L. angustifolius* po 7, 14, 21 i 28 dniach wykorzystanych do indukcji androgenezy

Wykres 1a. Dane metrologiczne ze Stacji Hodowli Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, Oddział Przebędowo w sezonie wegetacyjnym w 2016 r.

Wykres 1b. Dane metrologiczne ze Stacji Hodowli Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, Oddział Przebędowo w sezonie wegetacyjnym w 2017 r.

Wykres 1c. Dane metrologiczne ze Stacji Hodowli Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, Oddział Przebędowo w sezonie wegetacyjnym w 2018 r.

Wykres 2a. Dane metrologiczne ze Rolniczego Zakładu Doświadczalnego Swojec Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w sezonie wegetacyjnym 2016 r.

Wykres 2b. Dane metrologiczne ze Rolniczego Zakładu Doświadczalnego Swojec Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w sezonie wegetacyjnym 2017 r.

Wykres 2c. Dane metrologiczne ze Rolniczego Zakładu Doświadczalnego Swojec Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w sezonie wegetacyjnym 2018 r.

Wykres 3. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla wysokości pędu głównego rośliny u 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)

Wykres 4. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla wysokości całej rośliny u 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)

Wykres 5. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla liczby rozgałęzień produktywnych I rzędu u 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)

Wykres 6. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla długości kwiatostanów pędu głównego u 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)

Wykres 7. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla liczby okółków na pędzie głównym u 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)

Wykres 8. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla liczby zawiązywanych strąków na pędzie głównym u 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)

Wykres 9. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla długości kwiatostanów pędu boczego u 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)

Wykres 10. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla liczby okółków na pędzie bocznym u 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)

Wykres 11. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla liczby zawiązanych strąków na pędzie bocznym u 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)

Wykres 12. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla plonu z poletka 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)

Wykres 13. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla masy tysiąca nasion (MTN) u 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)

Wykres. 14. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla zawartości białka (%) u 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)

Wykres 15. Frekwencja linii w poszczególnych grupach dla zawartości tłuszczu u 108 linii łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius* L.)

Wykres 16. Dendrogram analizowanych cech morfologicznych i plonu *L. angustifolius* L.

Wykres 17. Analiza składowych głównych 108 linii RILs łubinu wąskolistnego z wyodrębnionymi klastrami dla cech morfologicznych i plonu

Wykres 18. Zachowanie się pyłku trzech genotypów *L. luteus* (500,501, Przebędowo) na znamionach czterech odmian *L. angustifolius*

Wykres 19. Analiza zachowania się mikrospor linii Lae-1 na podłożu hodowlanym B5 po 7, 14, 21 i 28 dniach obserwacji

Wykres 20. Analiza osi zarodkowych (stadium A) po 14 dniach od założenia kultury

Wykres 21. Analiza wzrostu zarodków (stadium A) po 28 dniach od założenia kultury

Wykres 22. Analiza wzrostu zarodków (stadium B) po 14 dniach od założenia kultury

Wykres 23. Analiza wzrostu zarodków (stadium B) po 28 dniach od założenia kultury

Zdjęcie 1. Analiza zachowania się obcego pyłku *L. luteus 501* w słupku łubinie wąskolistnego 'Karo'

Zdjęcie 2. Rozwój woreczka zalążkowego u *L. angustifolius* 'Karo' po przepyleniu pyłkiem *L. luteus 500*

Zdjęcie 3. Rozwój woreczka zalążkowego u *L. angustifolius* 'Karo' po przepyleniu pyłkiem *L. luteus 501*

Zdjęcie 4. Rozwój woreczka zalążkowego u *L. angustifolius* 'Karo' po przepyleniu pyłkiem *L. luteus Przebędowo*

Zdjęcie 5. Obserwacja zalążków linii Lae-1 po krzyżowaniu z *L. luteus 501* na pożywce ML6

Zdjęcie 6. Widoczna tkanka kalusowa po 30 dniach obserwacji na zalążkach uzyskanych po krzyżowaniu *L. angustifolius* z *L. luteus 500*

Zdjęcie 7. Pąki czterech genotypów łubinu wąskolistnego wykorzystane do indukcji androgenezy w kulturach izolowanych mikrospor

Zdjęcie 8. Stadium jednojądrowe w środkowym segmencie pąka odmiany Karo

Zdjęcie 9. Rozwój zarodków zygocycznych pobranych po 14 dniach od momentu samozapylenia

Zdjęcie 10. Rozwój zarodków zygocycznych pobranych po 28 dniach od samozapylenia

Zdjęcie 11. Aklimatyzacja roślin (stadium A i B) w szklarni oraz na polu pod tunelem z agrowłókniną

Zdjęcie 12. Odmiana Graf, Emir i Karo (stadium B) po aklimatyzacji w warunkach polowych

Zdjęcie 13. Struktury wielokomórkowe linii Lae-1 (autor Renata Galek)

Zdjęcie 14. Poziom ploidalności tkanki kalusowej zalążków pochodzących ze skrzyżowania linii Lae-1 x *L. luteus 500*