

Wrocław, 12.03.2023

dr hab. inż. Renata Galek, prof. uczelni
Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Walkowiak

**pt.: Genetyczne uwarunkowania składu kwasów tłuszczowych w nasionach form
oleistych lnu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.)
(zbiór 3 publikacji)**

Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. Stanisława Spasibionka w Zakładzie Roślin Oleistych IHAR-PIB, Oddział w Poznaniu.

1. UZASADNIENIE WYKONANIA RECENZJI

Uchwałą nr 1/XX67 RADY NAUKOWEJ Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie podjętą w dniu 15 grudnia 2022 r. w sprawie: wyznaczenia recenzentów rozprawy doktorskiej na podstawie art. 29 ust. 2 pkt 14 ustawy z 30 kwietnia 2010 r. o instytutach badawczych (Dz. U. z 2022r., poz.498), zgodnie z art. 179 ustawy z 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669) oraz ustawą z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) i Regulaminem Rady Naukowej z 12 października 2017 r. z późn. zm. - postanowiono o powołaniu mojej osoby na recenzenta rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Walkowiak. Recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo RN-001-181/2022 z dnia 20 grudnia 2023 roku skierowane przez Dyrektora Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB w Radzikowie dr inż. Michała Rokickiego.

2. ZASADNOŚĆ WYBORU TEMATU ROZPRAWY

Uprawę lnu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.) jako surowca włókienniczego i na cele spożywcze prowadzono już w Starożytnej Grecji i Egipcie. Obecnie mają znaczenie dwie

formy użytkowe lnu: len oleisty (*Linum usitatissimum* L. var. *Brevimulticaulis* Vav.) oraz włóknisty (*Linum usitatissimum* L. var. *Elongatum* Vav.). Do dzisiaj gatunek ten jest wykorzystywany do produkcji tkanin, w przemyśle spożywczym, ale również farmaceutycznym i kosmetycznym. Ponadto olej lniany służy też do produkcji farb olejnych, pokostów i lakierów. Makuchy lniane (produkt uboczny po tłoczeniu olejów zawierają 36% białka i 7% tłuszczu) stanowią cenny komponent pasz treściwych. Trwają badania nad wykorzystaniem oleju lnianego do produkcji biodiesla. W ostatnim okresie coraz większe znaczenie ma nietekstylne wykorzystanie włókna do produkcji wykładzin podłogowych i samochodowych, a także geowłóknin. Len włóknisty wykorzystywany jest do produkcji płyt lignocelulozowych stosowanych w budownictwie i przemyśle meblarskim, może być też stosowany do produkcji wysokiej jakości papieru. W USA len zaliczany jest do najważniejszych upraw w tzw. biogospodarce. Wg danych FAOstat z roku 2020 na świecie uprawiano 3,5 mln ha lnu, w tym udział Kazachstanu stanowił 37,9%, Federacji Rosyjskiej 27,5%, Kanady 10,5 %, Chin 7,1% i Indii 5,6%. Udział Unii Europejskiej wynosił jedynie 3,3% upraw lnu (115,8 tys. ha). W Polsce w latach siedemdziesiątych XX wieku powierzchnia uprawy lnu wynosiła 130 tys. ha i należeliśmy do światowej czołówki. W latach 80. i 90. ubiegłego wieku nastąpiło załamanie produkcji. Obecnie trwa proces jej odbudowy, a powierzchnia uprawy nie przekracza 6000 ha.. Od kilku lat na świecie obserwuje się wzrost produkcji nasion lnu, ale nadal jest ona niewielka w stosunku do światowych zbiorów wszystkich roślin oleistych. Zarówno na świecie jak i w Polsce ma to związek przede wszystkim z niskim i niestabilnym plonowaniem. **W przypadku użytkowania na nasiona nowym wyzwaniem dla hodowli okazało się poszukiwanie genotypów o zmienionych proporcjach kwasów tłuszczowych, gdyż istotnym ograniczeniem wykorzystania oleju lnianego na szeroką skalę jest jego krótka trwałość.** Ze względu na wysoką zawartość kwasu α -linolenowego olej lniany jest wrażliwy na działanie światła oraz temperatury i dlatego ulega szybkim przemianom sensorycznym oraz chemicznym obniżającym jego wartość odżywczą.

Z uwagi na cenne właściwości lnu należy propagować uprawę tego gatunku, ale musi być to poprzedzone odpowiednio ukierunkowanymi pracami genetyczno-hodowlanymi dla sprostania potrzebom rynku. **W związku z powyższym, stwierdzam, że Doktorantka podjęła badania ważne i istotne zarówno z poznawczego, jak i praktycznego (gospodarczego) punktu widzenia zmierzające do uzyskania pożądaných rekombinantów** o zmienionych proporcjach kwasów tłuszczowych, tj. obniżonej zawartości kwasu α -linolenowego i uzyskaniu mieszańców o stosunku kwasów: linolowego do α -

linolenowego 1:1 oraz 2:1. Taki skład kwasów tłuszczowych zapewnia większą trwałość produktu nie obniżając jego wartości dietetycznej.

3. OCENA FORMALNA ROZPRAWY

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Walkowiak obejmuje 115 stron. Składa się na nią polskojęzyczne opracowanie oraz odbitki trzech recenzowanych artykułów – jednego polskojęzycznego i dwóch anglojęzycznych wchodzących w skład cyklu publikacji i stanowiących rdzeń pracy. Prezentowane w dysertacji wyniki zamieszczone są w cyklu trzech spójnych tematycznie, wieloautorskich publikacjach, które ukazały się w latach 2018-2022:

1. Walkowiak Magdalena, Krótka Krystyna, Wielebski Franciszek, Michalski Krzysztof, Silska Grażyna, Praczyk Marcin, Spasibionek Stanisław (2018). Ocena zmienności i współzależności cech użytkowych w kolekcji oleistych odmian i rodów lnu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.). *Fragmenta Agronomica* 35 (4): 123–137 doi.10.26374/fa.2018.35.48;
2. **Walkowiak Magdalena**, Spasibionek Stanisław, Krótka Krystyna (2022). Variation and genetic analysis of fatty acid composition in flax (*Linum usitatissimum* L.) *Euphytica* 218: 2 doi.10.1007/s10681-021-02941-6m;
3. **Walkowiak Magdalena**, Matuszczak Marcin, Spasibionek Stanisław, Liersch Alina, Mikołajczyk Katarzyna (2022). Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for characterization of the *LuFAD3A* gene from various flax (*Linum usitatissimum* L.) cultivars. *Agronomy* 12: 1432 doi.10.3390/agronomy12061432.

Badania zostały wykonane w ramach czterech tematów statutowych realizowanych na przestrzeni lat 2013-2020. Wyniki opublikowano w dwóch czasopismach o wysokich współczynnikach oddziaływania (ang. impact factor, IF) wynoszących od IF_{5-letni} 4,117 do IF_{5-letni} 2,387, punktacji wg MEiN 170 pkt oraz w czasopiśmie o zasięgu ogólnokrajowym *Fragmenta Agronomica* o liczbie punktów 20 wg MNiSW pkt. **Łączny IF_{5-letni} w/w prac wynosi 6,504 a sumaryczna liczba punktów wg MNiSW i MEiN (od 2021 roku) 190, co świadczy o wysokim poziomie naukowym prac wchodzących w skład osiągnięcia i zostało pozytywnie ocenione przez niezależnych recenzentów czasopism.**

Według bazy Web of Science prace z 2022 roku były już cytowane odpowiednio 4 (w tym jedno autocytowanie) i 1 raz, co świadczy o aktualności problematyki badawczej podjętej

przez Doktorantkę. We wszystkich trzech pracach Pani mgr Magdalena Walkowiak jest pierwszym autorem i jednocześnie w dwóch autorem korespondencyjnym. Biorąc pod uwagę wymóg formalny oceny indywidualnego wkładu Doktorantki w powstanie publikacji (Dz.U. 2014 poz. 1383; 6 ust. 5 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 3 października 2014) spełnia ona to kryterium. Według oświadczeń dołączonych przez wszystkich współautorów, wkład Doktorantki w powstanie trzech publikacji był znaczący i został oszacowany odpowiednio na 50, 45, 35%. **Rola Doktorantki polegała na realizacji i koordynowaniu badań, interpretacji i dyskusji wyników oraz w przygotowaniu i korekcie w/w manuskryptów, co wskazuje na jej znaczący udział zarówno w prowadzonych badaniach jak również w powstawaniu końcowej wersji artykułów. Jest to niewątpliwie znaczący dorobek naukowy, osoby ubiegającej się o stopień naukowy doktora.**

Rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Walkowiak została podzielona na 10 tematycznych rozdziałów. Rozdziały kolejno zawierają: wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzenie - przegląd literatury, cel badań i hipotezy badawcze, materiał i metody, omówienie wyników, podsumowanie uzyskanych wyników i wnioski, spis literatury, publikacje będące podstawowym elementem osiągnięcia oraz oświadczenia dotyczące udziału kandydata i współautorów w przygotowanej pracy doktorskiej. Obejmuje również oświadczenia: promotora i autora rozprawy doktorskiej, informacje o finansowaniu badań w ramach tematów statutowych, podziękowań, oraz wykazu skrótów stosowanych w pracy. Tytuł pracy odpowiada tematyce publikacji będących przedmiotem osiągnięcia. **Całość dysertacji została skrupulatnie przygotowana, a jej układ jest czytelny i zgodny z wymogami formalnymi wydań rozpraw doktorskich.**

4. OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Zredagowane przez Autorkę 'Wprowadzenie' odzwierciedla celowość podjętych badań. Przedstawiony przegląd literatury został bogato poparty cytatami, a ilość źródeł literaturowych, na które powołuje się Doktorantka wskazuje na bardzo dobrą znajomość problematyki badanego gatunku. W rozdziale tym Autorka prezentuje pochodzenie gatunku, jego znaczenie gospodarcze, rolę kolekcji i indukowania nowej zmienności na potrzeby hodowli, a także możliwość wykorzystania narzędzi biotechnologicznych w doskonaleniu lnu i poznania jego genomu. Autorka wskazuje też osiągnięcia w hodowli lnu jako rośliny użytkowej i aktualne kierunki hodowli. Mam uwagę do przytaczanych danych dotyczących

parametrów jakościowych nasion, a zwłaszcza zawartości tłuszczu. Na stronie 14 możemy znaleźć informację, że „Formy oleiste charakteryzują sięwysoką zawartością tłuszczu (40-45%). Formy włókniste natomiast cechują się niższą zawartością tłuszczu (36-40%) (Wałkowski i in. 1998, Woyke i Muśnicki 1999).” a na stronie 15 ”Nasiona lnu zawierają 30-45% tłuszczu.” Może warto by było uporządkować tego typu informacje i odnieść się również do zakresu parametrów jakościowych odmian scharakteryzowanych w warunkach Polski (Lista Opisowa Odmian Roślin Rolniczych 2020)?

W kolejnym IV rozdziale Autorka przedstawiła trzy hipotezy badawcze, jeden cel naukowy i trzy cele szczegółowe. Sformułowane hipotezy badawcze są właściwe merytorycznie i wskazują na przeprowadzenie przez Autorkę wnikliwej oceny stanu wiedzy dotyczącego roli rozpoznania zmienności genetycznej oraz odziedziczalności cech w hodowli twórczej lnu, a także wykorzystania markerów molekularnych w selekcji pożądanych genotypów.

Materiał i metody wykorzystane w badaniach Doktorantka opisała w rozdziale V. Przedmiotem badań w poszczególnych doświadczeniach było: 31 genotypów, w tym odmiany i rody hodowlane lnu zwyczajnego zgromadzonych w ramach kolekcji, 6 form rodzicielskich zróżnicowanych pod względem zawartości kwasów (oleinowego, linolowego, α -linolenowego) i uzyskanych, po ich skrzyżowaniu w układzie diallelicznym, 30 mieszańców. Zastosowane w trakcie realizacji prac metody fenotypowania oraz analizy statystyczne i molekularne są jak najbardziej właściwe i nie budzą zastrzeżeń merytorycznych.

Doświadczenia realizowane w ramach poszczególnych etapów pracy wskazują na znaczną pracowitość na etapie zarówno przeprowadzania jak i gromadzenia danych empirycznych. Podjęty zakres analizowanych cech w kontekście celu pracy jest właściwy. Rozdział ten jest czytelny i dostarcza w większości wystarczającą ilość informacji co do sposobu i zakresu prowadzonych badań. Jednakże wkradła się pewna nieścisłość na stronie 27, gdzie autorka wyszczególnia materiał badawczy przypisany do badań nad sposobem dziedziczenia kwasów tłuszczowych i wskazuje, że ‘Do badań nad sposobem dziedziczenia kwasów tłuszczowych 18-węglowych z kolekcji wybrano 6 genotypów zróżnicowanych pod względem zawartości kwasów: oleinowego, linolowego i α -linolenowego...’ nie wspominając, że bazowano również tutaj na mieszańcach. Informację tą można znaleźć w dalszej części dysertacji dotyczącej metod. W kontekście przeprowadzonej oceny materiałów kolekcyjnych w pierwszej pracy zabrakło mi w części metodycznej charakterystyki warunków klimatycznych, za to bardzo szczegółowo opisano warunki glebowe i agrotechniczne.

Badania, które zostały zrealizowane przez Doktorantkę stanowią kompleksowe ujęcie analizy uwarunkowań genetycznych mających wpływ na udział ilościowy poszczególnych

kwasów tłuszczowych w nasionach lnu oleistego. Rozdział VI zawiera syntetyczne omówienie wyników zaprezentowanych w publikacjach uwzględnionych w dysertacji, które były już ocenione przez recenzentów. W pracy pierwszej wykazano dużą zmienność wśród zgromadzonych materiałów kolekcyjnych zarówno pod względem wybranych faz fenologicznych, plonu i elementów jego struktury, a także składu jakościowego nasion. Dzięki zastosowaniu analizy skupień w oparciu o metodę Warda pogrupowano obiekty pod względem ich podobieństwa. Doktorantka pominęła ciekawe informacje dotyczące zależności między cechami. Uzyskane wyniki w tej części doświadczeń przyczyniły się do zasadnego doboru form rodzicielskich do krzyżowań i uzyskaniu w dalszej konsekwencji interesującej puli mieszańców, co zaskutkowało zweryfikowaniem postawionych w dysertacji hipotez i osiągnięciem zamierzonych celów badawczych. Wyniki badań opublikowane w drugim artykule wchodzącym w skład osiągnięcia jednoznacznie wskazały skuteczność metod statystycznych przy ocenie wartości hodowlanej genotypów i wyznaczeniu sposobów dziedziczenia analizowanych cech. Doktorantka wyznaczyła wariancję ogólnej i specyficznej zdolności kombinacyjnej, stopień dominacji ($H_1/D^{1/2}$), liczbę grup genów wykazujących dominację (h^2/H_2), stosunek liczby alleli dominujących do recesywnych ($H_2/4xH_1$), stosunek liczby genów dominujących do recesywnych $[(DH1)^{1/2}+F]/[(4DH1)^{1/2}-F]$, odziedziczalność w szerokim (h^2BS) i wąskim (h^2NS) sensie dla trzech kwasów tłuszczowych: (C18:1; ω -9), (C18:2; ω -6), (C18:3; ω -3). Podstawą obliczeń były wyniki uzyskane z dwóch sezonów wegetacyjnych (2014, 2016). Oszacowane parametry genetyczne wykazały addytywne działanie genów w syntezie kwasu linolowego i α -linolenowego, natomiast nieaddytywne działanie genów decydowało o zawartości kwasu oleinowego. W kontekście uzyskanych wyników Doktorantka konsekwentnie podejmuje dalsze badania związane z opracowaniem starterów CAPS do identyfikacji zmutowanych alleli genu *LuFAD3A* odpowiedzialnego za niską zawartość kwasu α -linolenowego. Zastosowany marker nie potwierdził obecności zmutowanych alleli genu dla niskolinolenowych form lnu oleistego Linola KLA i Linola KLB, co może wskazywać, że za brak aktywności desaturazy FAD3 w tych liniach odpowiada inna mutacja.

VII rozdział obejmuje podsumowanie uzyskanych wyników oraz wnioski. W tym rozdziale zabrakło mi odniesienia się w formie krótkiej dyskusji do prac genetyczno-hodowlanych realizowanych na świecie w świetle uzyskanych i opisanych w trzech publikacjach wyników wchodzących w skład osiągnięcia. Sformułowane wnioski częściowo są powtórzeniem treści z poprzedniego rozdziału.

Jednym z końcowych elementów rozprawy doktorskiej jest „Spis literatury: obejmujący 139 pozycji literatury zarówno w języku angielskim jak i polskim, cytowanych alfabetycznie. Należy zaznaczyć, że około 20% pozycji stanowią publikacje z ostatnich dziesięciu lat (2013-2023). Dobór piśmiennictwa jest bardzo bogaty i związany z tematyką recenzowanej pracy. Doktorantka redagując dysertację nie ustrzegła się błędów interpunkcyjnych czy stylistycznych, które to zaznaczyłam w opracowaniu. Nie umniejszają one wartości merytorycznej.

Dysertacja ma dobry poziom naukowy biorąc pod uwagę każdy z rozpatrywanych artykułów.

Do najważniejszych osiągnięć w ocenianej dysertacji zaliczam:

- Przeprowadzenie szczegółowej oceny kolekcji odmian i rodów hodowlanych lnu zwyczajnego, zgromadzonej w banku genów Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych IHAR-PIB w Radzikowie oraz w IHAR-PIB Oddział w Poznaniu, pod względem faz fenologicznych, plonu i elementów z nim związanych oraz cech jakościowych nasion. Tego typu kompleksowe opracowanie daje możliwość wykorzystania interesujących genotypów w praktycznej hodowli roślin, a także może posłużyć do wyprowadzania materiałów do analiz genetycznych.

- Wykazanie, że genotypy rodzicielskie typu Linola (Linola KLA i Linola KLB), o istotnie najwyższej dodatniej wartości GCA dla kwasu linolowego i istotnie najwyższej ujemnej wartości GCA dla kwasu α -linolenowego, adekwatnie zwiększały zawartość kwasu linolowego i obniżały zawartość kwasu α -linolenowego w nasionach mieszańców.

- Otrzymanie na drodze krzyżowania diallelicznego pożądanych rekombinantów lnu oleistego o zmienionym profilu kwasów tłuszczowych do hodowli nowych odmian o zawartości kwasu linolowego do α -linolenowego w proporcji 1:1 oraz 2:1, co bezpośrednio ma przełożenie aplikacyjne, gdyż pozwala uzyskać wyższą trwałość oleju nie pogarszając jego wartości żywieniowych.

- Udokumentowanie roli addytywnego działania genów w kontekście dziedziczenia zawartości kwasu linolowego i kwasu α -linolenowego a nieaddytywnego w przypadku zawartości kwasu oleinowego oraz wyznaczenie stopnia odziedziczalności.

- Zainicjowanie badań nad poszukiwaniem markerów molekularnych, które mogłyby w przyszłości być przydatne w selekcji genotypów lnu o pożądanym składzie tłuszczu, w tym przypadku niskiej zawartości kwasu α -linolenowego.

W tym miejscu bardzo proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do następujących zagadnień:

1. Jednym z aspektów przeprowadzonych eksperymentów było oszacowanie zróżnicowania zgromadzonych materiałów kolekcyjnych na podstawie trzyletnich doświadczeń. Czy oceniano rolę interakcji genotypowo-środowiskowej na kształtowanie się analizowanych cech – zwłaszcza plonu i parametrów jakościowych nasion? Czy rozpatrywano jak warunki pogodowe mogą wpływać na ważniejsze badane cechy użytkowe u lnu?
2. W pracach hodowlanych nad nowymi odmianami lnu kładzie się nacisk na poprawienie wydajności i jakości surowca – słomy i nasion, a także zwiększenie odporności roślin na choroby, zwłaszcza fuzariozę oraz redukcję podatności na wyleganie. Ostatnio obserwuje się tendencję hodowli tzw. odmian dwucelowych, które łączą cechy form włóknistych i oleistych w jednym genotypie. Czy zgromadzona kolekcja wychodzi naprzeciw tym oczekiwaniom?
3. Czy badano uwarunkowania genetyczne, w tym odziedziczalność innych cech biorąc pod uwagę otrzymany materiał w wyniku krzyżowania diallelicznego?
4. Chciałam poznać opinię Doktorantki o możliwości, zasadność wykorzystania zdobyczy epigenetyki w doskonaleniu lnu.

5. OCENA KOŃCOWA

Poddana ocenie rozprawa koncentruje się na istotnym zagadnieniu i stanowi interesujące wielowątkowe studium badawcze. Charakteryzuje się zarówno elementami poznawczymi jak i o wymiarze aplikacyjnym w hodowli lnu. Autorka dowiodła roli uwarunkowań genetycznych determinujących profil kwasów tłuszczowych w nasionach lnu. Wykazała się umiejętnością powiązania różnych metod badawczych podczas przeprowadzania doświadczeń polowych, laboratoryjnych, w tym z wykorzystaniem elementów biologii molekularnej a także znajomością narzędzi statystycznych stosowanych w genetyce ilościowej i umiejętnością interpretacji uzyskanych wyników. Cały zaplanowany proces uzyskania odpowiednich materiałów do badań należał do niełatwych, czasochłonnych i wymagający bardzo dobrze przeprowadzonego fenotypowania.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Magdaleny Walkowiak pt. „Genetyczne uwarunkowania składu kwasów tłuszczowych w nasionach form oleistych lnu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.)” spełnia wymogi stawiane tego typu pracom, określone w ustawie z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami

DZ.U. z 2017 r. poz. 1789) uwzględniając rozporządzenie MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie profesora (DZ.U. z 2018 r. poz. 261). **Jednocześnie wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Radzikowie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Magdaleny Walkowiak, ubiegającej się stopień naukowy doktora, do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Dr hab. inż. Renata Galek, prof. uczelni