

AUTOREFERAT

Załącznik 3

Dr inż. KAROLINA SUSEK

INSTYTUT GENETYK ROŚLIN POLSKIEJ AKADEMII NAUK W POZNANIU

ZAKŁAD GENOMIKI

ZESPÓŁ STRUKTURY I FUNKCJI GENÓW

POZNAŃ 2019

1. Imię i nazwisko.

Karolina Susek

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Doktor nauk rolniczych w zakresie agronomii – nadany przez Radę Naukową Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu (2009).

Tytuł rozprawy doktorskiej: *Lokalizacja wybranych grup sprzężeń w chromosomach lubinu wąskolistnego (Lupinus angustifolius L.)*; promotor: dr hab. Barbara Naganowska.

Magister inżynier biotechnologii – Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, obecnie Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu (2004).

Tytuł pracy magisterskiej: *Analiza restrykcyjna rDNA grzybów patogenicznych z rodzaju Hirsutella*; promotor: dr Dorota Narożna.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

01.08.2013 – obecnie	Adiunkt; Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, Zakład Genomiki, Zespół Struktury i Funkcji Genów.
01.10.2010 – 31.07.2013	Adiunkt; Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Anatomii i Cytologii Roślin.
02.10.2009 – 30.09.2010	Asystent; Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Anatomii i Cytologii Roślin.

4. Wskazanie osiągnięcia¹ wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Porównawcza analiza cytomolekularna genomów w rodzaju Lupinus.

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)

Osiągnięcie naukowe obejmuje cykl trzech prac, których sumaryczny IF wynosi 10,248; łączna wartość punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego wynosi 105.

* autor korespondencyjny, ‡ pierwsza pozycja podzielona

P1: Susek K.^{*‡}, Bielski W.K.[‡], Hasterok R., Naganowska B., Wolko B. (2016). A first glimpse of wild lupin karyotype variation as revealed by comparative cytogenetic mapping. *Frontiers in Plant Science* 7:1152, doi: [org/10.3389/fpls.2016.01152](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01152)

IF₂₀₁₆ = 4,291 / MNiSW₂₀₁₆ = 40

P2: Susek K.^{*}, Bielski W., Czyż K.B., Hasterok R., Jackson S.A., Wolko B., Naganowska B. (2019). Impact of chromosomal rearrangements on the interpretation of lupin karyotype evolution. *Genes* 10:259, doi: [org/10.3390/genes10040259](https://doi.org/10.3390/genes10040259)

IF₂₀₁₇ = 3,191 / MNiSW₂₀₁₆ = 25

P3: Susek K.^{*‡}, Braszewska-Zalewska A.[‡], Bewick A.J., Hasterok R., Schmitz R.J., Naganowska B. (2017). Epigenomic diversification within the genus *Lupinus*. *PlosOne* 22;12(6):e0179821, doi: [org/10.1371/journal.pone.0179821](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179821)

IF₂₀₁₇ = 2,766 / MNiSW₂₀₁₆ = 40

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Ewolucja, jako naturalny proces ukierunkowanych i ciągłych zmian zachodzących w organizmach, jest źródłem pochodzenia ich bioróżnorodności. Rośliny charakteryzują się różną wielkością i strukturą genomów, która na poziomie chromosomów przejawia się różną organizacją kariotypów. Wgląd w organizację chromosomów pozwala zrozumieć mechanizmy ewolucyjne uczestniczące w kształtowaniu się genomów roślinnych, tj. liczbę, wielkość i skład chromosomów. Wyjaśnia również plastyczność genomów, a także możliwości ich modyfikacji w procesach adaptacyjnych i hodowlanych.

Badania cytogenetyczne, dotyczące porównawczej analizy kariotypów, wskazują na udział szeregu przemian chromosomowych w trakcie ewolucji. Rearanżacje chromosomowe prowadzą do zmian zarówno w strukturze i morfologii chromosomów (m.in. insercje, delecje, inwersje, duplikacje), jak i ich liczbie (np. fuzje-fizje, translokacje). Zmienność liczby chromosomów może dotyczyć zwielokrotnienia całego haploidalnego zespołu chromosomów (poliploidy) lub tylko niektórych chromosomów (aneuploidy).

Większość ważnych roślin uprawnych to poliploidy, a wśród strączkowych zalicza się do nich m.in. soję i fasolę (Renny-Byfield i Wendel, 2014). Przypuszcza się, że łubiny, jako przedstawiciele roślin strączkowych nie stanowią pod tym względem wyjątku (Zhu i in., 2005).

Łubiny (*Lupinus*) należą do rodziny bobowatych (Fabaceae, strączkowe), podrodziny bobowatych właściwych (Faboideae, Papilionoideae), plemienia Genisteae. Gatunki tworzące ten rodzaj to zarówno rośliny zielne jednoroczne, jak i wieloletnie, o pokroju krzewów, a nawet drzew (Gladstones, 1998). Łubiny, ze względu na rozmieszczenie geograficzne podzielono na dwie grupy. Jedną z nich tworzą łubiny Starego Świata, obejmujące dwanaście jednorocznych gatunków, charakteryzujące się złożoną budową blaszki liściowej, rozmieszczonych w regionie basenu Morza Śródziemnego i Afryki Północnej. Natomiast większość gatunków zarówno jednorocznych, jak i wieloletnich, o liściach złożonych lub prostych, należy do łubinów Nowego Świata, występujących w zachodniej części Ameryki Północnej oraz andyjskim i atlantyckim regionie Ameryki Południowej (Gladstones, 1998).

Łubiny Starego Świata, w przeciwieństwie do łubinów Nowego Świata, charakteryzują się zróżnicowaną somatyczną liczbą chromosomów ($2n=32-52$) i podstawową liczbą chromosomów ($x=5-9, 13$). Tak zróżnicowana liczba chromosomów i wielkość genomów przemawiają za występowaniem procesów poliploidyzacji (Naganowska i in., 2003, 2006).

Ponadto, wśród łubinów Starego Świata wyróżniono dwie grupy łubinów. Grupa łubinów gładkonasiennych (*Malacospermae*) obejmuje gatunki z sekcji *Angustifolius*, *Albus*, *Luteus* i *Micranthus*. Natomiast do łubinów szorstkonasiennych (*Scabrispermae*) należą gatunki z sekcji *Atlanticus* i *Pilosus* (Naganowska i in., 2003). Badania cytologiczne pokazały, że łubiny gładkonasienne cechują się liczbą chromosomów $2n=40, 50, 52$, podczas gdy łubiny szorstkonasienne liczbą chromosomów $2n=32, 36, 38, 42$. Warto także nadmienić, że wśród łubinów Starego Świata występują trzy gatunki uprawne: *Lupinus angustifolius* ($2n=40$), *Lupinus albus* ($2n=50$) i *Lupinus luteus* ($2n=52$).

Wyjaśnienie pochodzenia i drogi ewolucyjnej łubinów (*Lupinus*) jest przedmiotem badań prowadzonych od wielu lat. Ostatnie badania wskazują na pochodzenie rodzaju *Lupinus* z obszarów Starego Świata (Drummond i in., 2012). Wyniki badań filogenetycznych pokazały, że łubiny oddzieliły się od innych roślin strączkowych około 17-22,5 mln lat temu (mlt). Na podstawie tych analiz wyróżniono trzy linie ewolucyjne obejmujące: 1) łubiny Starego Świata (4,6-12,5 mlt) wraz z łubinami (o pojedynczej budowie blaszki liściowej) z regionu wschodniej Ameryki Północnej (0,1-2,4 mlt); 2) łubiny wschodniej Ameryki Południowej (2,3-7,1 mlt) i 3) łubiny z zachodniego regionu Nowego Świata (5,0-13,2 mlt) wraz z gatunkami andyjskimi

i meksykańskimi (1,2-3,5 mlt) wywodzące się z parafiletycznej grupy łubinów z zachodniej Ameryki Północnej (2,1-5,5 mlt) (Drummond i in., 2012).

Łubiny jako przedstawiciele roślin strączkowych cechują się wysoką zawartością białka (około 40%) w nasionach. Nasiona te, stanowią cenne źródło białka w żywieniu zwierząt, a także coraz częściej ludzi. Ponadto, zawartość innych ważnych składników odżywczych, takich jak kwasy tłuszczowe, skrobia, błonnik, minerały i witaminy wpływa na wzrost zainteresowania łubinami jako cennym źródłem pokarmu dla ludzi. Wykorzystanie łubinów wraz z innymi dobrze zbadanymi i powszechnie spożywanymi roślinami strączkowymi może zróżnicować ofertę żywności dla coraz większej liczby wegetarian i wegan.

Co ważne, łubiny zapewniają wyjątkowe korzyści dla zrównoważonego rolnictwa poprzez zwiększenie żyzności i jakości gleby, a stosowane jako poplon wpływają korzystnie na plonowanie roślin następczych. Ich zdolność do symbiozy z bakteriami wiążącymi azot atmosferyczny odgrywa kluczową rolę w ograniczaniu stosowania syntetycznych nawozów azotowych i zmniejszaniu wpływu produkcji roślinnej na środowisko.

Wśród łubinów, *L. angustifolius* (łubin wąskolistny) jest gatunkiem najlepiej poznanym pod względem genetycznym i cytogenetycznym. Badania z zakresu genetyki, biologii i cytogenetyki molekularnej pozwoliły na utworzenie biblioteki BAC genomu jądrowego dla *L. angustifolius* odm. Sonet (Kasprzak i in., 2006) i odm. Tanjil (Gao i in., 2011), map genetycznych (Nelson i in., 2010), przypisanie grup sprzężeń do chromosomów (Lesniewska i in., 2011), sekwencjonowanie genomu i transkryptomu (Kamphuis i in., 2015, Hane i in., 2017) i skonstruowanie idiogramu (Wyrwa i in., 2016). Opracowanie powyższych narzędzi badawczych pozwoliło na ukonstytuowanie łubinu wąskolistnego jako gatunku referencyjnego w obrębie rodzaju *Lupinus*.

Głównym przedmiotem moich zainteresowań naukowych było prześledzenie i porównanie organizacji chromosomów w celu **poznania i zrozumienia mechanizmów prowadzących do zróżnicowania chromosomów** łubinów Starego Świata. Problematyka naukowa obejmowała dwa aspekty badawcze: (i) charakterystykę struktury chromosomów i ich przemian w toku ewolucji (**publikacje P1 i P2**) oraz (ii) poznanie i porównanie modyfikacji epigenetycznych (**publikacja P3**). Istotnym celem badań było także opracowanie pierwszych narzędzi badawczych i zasobów cytogenomowych dla łubinów. Szczególnie, zważywszy na ograniczony zasób danych genomowych dla łubinów, poza stosunkowo dobrze poznanym

L. angustifolius. W świetle opublikowanych badań, prezentowane wyniki są nowatorskie w tej grupie roślin. Mogą stanowić bazę do dalszych badań porównawczych dla międzynarodowej społeczności naukowej w różnych dziedzinach nauk podstawowych i aplikacyjnych.

Ulepszanie roślin uprawnych stanowi wyzwanie w procesach hodowlanych w celu zapewnienia wysokiej jakości żywności. Poznanie organizacji genomów łubinów jest ważnym etapem w hodowli roślin. Łubiny są cennym źródłem wartościowych składników odżywczych. Zanim jednak potencjał łubinów zostanie w pełni wykorzystany, konieczne jest prowadzenie wielokierunkowych badań w celu zrozumienia podstawowych mechanizmów biologicznych. W przyszłości mogą one doprowadzić do postępu hodowlanego dla otrzymywania nowych, ulepszonych odmian łubinów, spełniających wymagania i oczekiwania 'Zielonej Rewolucji'.

P1: Susek K.^{*‡}, Bielski W.K.[‡], Hasterok R., Naganowska B., Wolko B. (2016). A first glimpse of wild lupin karyotype variation as revealed by comparative cytogenetic mapping. *Frontiers in Plant Science* 7:1152.

Praca ta została wyróżniona nagrodą za najlepszą oryginalną pracę z zakresu genetyki, przyznaną przez Polskie Towarzystwo Genetyczne.

Badania zrealizowano w ramach kierowanego przeze mnie projektu OPUS 2 pt. *Cytomolekularny wgląd w genomy *Lupinus** (Narodowe Centrum Nauki, nr 2011/03/B/NZ2/01420; 2012-2016). Projekt ten prowadziłam w ramach współpracy z prof. dr. hab. Robertem Hasterokiem z Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

Wyniki badań stanowiły podstawę do złożenia wniosku projektu PRELUDIUM 12 pt. *Zróznicowane losy chromosomów łubinów* (Narodowe Centrum Nauki, nr 2016/23/N/NZ2/01509; 2017-2019). Projekt realizowany jest w ramach rozprawy doktorskiej mgr. Wojciecha Bielskiego, w której pełnię funkcję promotora pomocniczego.

CEL 1: Identyfikacja chromosomów łubinów

Organizacja genomów łubinów na poziomie chromosomów wzbudziła moje zainteresowanie naukowe, a opracowany system identyfikacji chromosomów (Wyrwa et al., 2106) umożliwił mi zainicjowanie pionierskich porównawczych badań wśród łubinów Starego Świata. W pierwszym etapie badań opracowano markery cytogenetyczne dla wybranych gatunków łubinów w celu precyzyjnej identyfikacji chromosomów i określenia zróznicowania kariotypów u łubinów Starego Świata. W badaniach wykorzystano pulę markerów BAC

opracowanych przez Lesniewska i in. (2011). Utworzono także markery chromosomów *L. angustifolius* pochodzące z drugiej biblioteki BAC genomu jądrowego *L. angustifolius* (Gao i in., 2011). Następnie, przeprowadzono porównawcze mapowanie cytogenetyczne wśród gatunków o zróżnicowanej liczbie chromosomów i reprezentujących różne sekcje: *L. cosentinii* ($2n=32$), *L. cryptanthus* ($2n=40$), *L. pilosus* ($2n=42$) i *L. micranthus* ($2n=52$) oraz jednego gatunku Nowego Świata *L. multiflorus* ($2n=36$), w odniesieniu do *L. angustifolius*, jako gatunku referencyjnego. Zastosowanie techniki fluorescencyjnej *in situ* hybrydyzacji (FISH) z klonami BAC jako sondami molekularnymi pozwoliło na identyfikację kilku chromosomów u badanych łubinów. Liczba specyficznych markerów BAC dla chromosomów badanych gatunków, w zależności od stopnia pokrewieństwa filogenetycznego, wynosiła od 11 klonów (69% wszystkich klonów) u *L. cryptanthus*, pięciu u *L. micranthus* (31%), czterech u *L. pilosus* (25%), trzech u *L. cosentinii* (19 %) do dwóch u *L. multiflorus* (12,5%).

W pracy przedstawiono charakterystykę markerów i ich użyteczność dla badań genomów łubinów. Według mojej wiedzy, są to **pierwsze markery** specyficzne dla chromosomów dzikich gatunków łubinów. Jest to tym ważniejsze, że markery rybosomalnego DNA (rDNA), choć efektywne w analizach kariotypów wielu innych roślin, np. Brassicaceae (Hasterok i in., 2006), Apiaceae (Iovene i in., 2008) i *Prospero* (Jang i in., 2013), okazały się mało użyteczne w rodzaju *Lupinus* (Naganowska i Zielinska, 2002; Hajdera i in., 2003). Większość łubinów posiada tylko jeden locus 5S rDNA, z wyjątkiem *L. angustifolius* odm. Emir, który ma cztery loci (Hajdera i in., 2003) i *L. cryptanthus* posiadający dwa loci (Susek i in., 2016). Z kolei geny 45S rRNA występują w jednej parze chromosomów *L. angustifolius*, *L. micranthus* i *L. multiflorus*, dwóch u *L. pilosus* i trzech u *L. cosentinii* (Naganowska i Zielinska, 2002; omawiana praca).

Wnioski:

Markery BAC, specyficzne dla chromosomów *L. angustifolius*, są cennym i skutecznym narzędziem do identyfikacji chromosomów u spokrewnionych gatunków łubinów. Stanowią bazę, która może być wykorzystana do integracji chromosomów i map genetycznych innych łubinów, np. łubinów uprawnych – *L. albus* i *L. luteus*. Warto podkreślić, że badania porównawcze z zastosowaniem metody BAC-FISH pokazały, że to podejście badawcze ma zastosowanie nie tylko wśród gatunków łubinów Starego Świata, blisko spokrewnionych z *L. angustifolius*, ale również wśród przedstawicieli łubinów Nowego Świata.

Opracowane podejście badawcze oraz zestaw markerów stały się podstawą do realizacji kolejnego celu badawczego, związanego z identyfikacją podobieństwa strukturalnego genomu *L. angustifolius* i gatunków pokrewnych.

CEL 2: Wgląd w rearanżacje chromosomów u wybranych gatunków łubinów

Mapowanie porównawcze z wykorzystaniem klonów pochodzących z jednego gatunku umożliwia identyfikację regionów homeologicznych w chromosomach pokrewnych gatunków (Xiong i Pires, 2011; Fonseca i Pedrosa-Harand, 2013) i pozwala prześledzić ich ewolucję (Lin i in., 2010; Wolny i in., 2011). Idea ta, zaadaptowana do planu moich badań, pozwoliła zidentyfikować różnice w organizacji chromosomów łubinów, a także określić regiony synteniczne pomiędzy badanymi łubinami. Na podstawie mapowania chromosomów metodą BAC-FISH zaobserwowano różnice w organizacji ‘unikatowych’ klonów BAC w chromosomach badanych łubinów, w porównaniu z *L. angustifolius*. Najmniejsze różnice w strukturze chromosomów wykryto pomiędzy *L. angustifolius* i *L. cryptanthus*, co najprawdopodobniej można wyjaśnić faktem, że obydwa gatunki są ze sobą blisko spokrewnione – *L. cryptanthus* jest uważany za dziką formę *L. angustifolius* (Naganowska i in., 2003). Jednakże, u pozostałych badanych łubinów różnice we wzorze lokalizacji klonów BAC były większe, co może świadczyć o licznych i złożonych rearanżacjach strukturalnych, które miały miejsce podczas różnych zdarzeń ewolucyjnych u łubinów. Zróżnicowane wzory lokalizacji ‘powtarzalnych’ klonów potwierdziły złożoną organizację sekwencji klonów BAC w chromosomach badanych łubinów i zobrazowały rozmieszczenie sekwencji powtarzalnych u badanych gatunków. Interesująca była lokalizacja klonów w wielu chromosomach, wraz ze wzmocnionym sygnałem po BAC-FISH w dystalnych odcinkach chromosomów. Świadczyć to może o licznych rearanżacjach w obrębie tych regionów chromosomów i sugerować, że dystalne regiony chromosomów były podatne na różnego rodzaju zmiany strukturalne.

Organizacja ruchomych elementów genetycznych (ang. Transposable Elements, TE) może być konsekwencją licznych przemian kariotypu i odpowiedzią na określone warunki środowiskowe (Wicker i Keller, 2007). Co ciekawe, analiza sekwencji powtarzalnych należących do dwóch podstawowych klas TE była porównywalna w analizowanych klonach BAC. Pomimo, że retrotranspozony LTR stanowiły najliczniejszą klasę TE genomu *L. angustifolius* odm. Tanjil, oszacowaną na podstawie sekwencji końców klonów BAC (Gao i in., 2011). Analiza organizacji i ewolucji sekwencji ruchomych w genomach roślinnych jest zadaniem niezwykle trudnym. Precyzja i efektywność analiz sekwencji powtarzalnych zależy

od jakości sekwencji całego genomu (Hoen i in., 2015), która w przypadku *L. angustifolius* podlega ciągłym udoskonaleniom (Hane i in., 2017).

W pracy zasugerowaliśmy, że **przemiany chromosomowe oparte na fuzjach-fizjach** mogą mieć kluczową rolę w ewolucji łubinów. Zjawisko to, szeroko badane w trawach, w szczególności u zbóż (Salse i Feuillet, 2011), zostało również zaobserwowane u strączkowych (Murat i in., 2015). Odnosząc się do otrzymanych wyników cytogenetycznych i danych filogenetycznych (Drummond i in., 2012) przedstawiono hipotetyczną drogę ewolucji kariotypów u badanych łubinów. Zaproponowany **kierunek ewolucji, oparty na redukcji chromosomów i licznych rearanżacjach** chromosomowych jest zbieżny z analizami paleogenomicznymi (Murat i in., 2015). O zachodzących przemianach chromosomowych przemawiają również porównawcze badania genetyczne (Kroc i in., 2014) i analizy filogenetyczne, z wykorzystaniem sekwencji transkryptomów (Cannon i in., 2015), które sugerują występowanie duplikacji i/lub triplikacji u *L. angustifolius*.

Wnioski:

Porównawcze mapowanie genomów metodą BAC-FISH nakreśliło skomplikowaną i zawiłą naturę ewolucji kariotypów łubinów. Badania rozpoczęły rozdział analiz porównawczych mających na celu lepsze zrozumienie mechanizmów ewolucyjnych, które kształtują strukturę i skład genomu łubinu. Łubiny, które obejmują zarówno uprawne, jak i dzikie gatunki dzikie, wykazują wysoki poziom dywersyfikacji genomowej, a zatem mogą być cennym modelem do śledzenia procesów poliploidyzacji i określenia ich roli w ewolucji genomu i adaptacji roślin. Przedstawiona charakterystyka TE u *L. angustifolius*, stanowi bazę dla dalszej identyfikacji rodzin i/lub typów sekwencji powtarzalnych w celu wytypowania sekwencji specyficznych dla łubinów.

Rośliny należące do plemienia Genisteae stanowią, pod względem poznania procesów poliploidyzacyjnych, najmniej scharakteryzowaną grupę w obrębie roślin strączkowych (Doyle, 2012). Przedstawione podejście badawcze, wraz z rozwojem zasobów genetycznych, może być użyteczne dla zrozumienia ewolucji gatunków z innych rodzajów z plemienia Genisteae, tj. *Ulex* ($2n=80, 96$), *Genista* ($2n=48$) i *Crotalaria* ($2n=14, 16$).

Przeprowadzenie cytogenetycznego mapowania porównawczego wskazało również perspektywy na wykrycie przemian chromosomowych zachodzących podczas ewolucji w całej grupie łubinów Starego Świata. W celu szerszego zrozumienia przemian chromosomowych, prześledziliśmy zróżnicowanie chromosomów u pozostałych łubinów. Zaplanowane badania

więzały się z dużym nakładem pracy i czasu. Były też wyzwaniem badawczym, ze względu na liczne chromosomy o podobnej morfologii i złożoną strukturę genomów łubinów.

P2: Susek K.*, Bielski W., Czyż K.B., Hasterok R., Jackson S.A., Wolko B., Naganowska B. (2019). Impact of chromosomal rearrangements on the interpretation of lupin karyotype evolution. *Genes* 10, 259.

Praca ta została wyróżniona poprzez prezentację zdjęcia na okładce czasopisma *Genes*, Special Issue *Genomics of Plant Domestication and Crop Evolution*.

Badania zostały zrealizowane w ramach projektu OPUS 2 pt. *Cytomolekularny wgląd w genomy *Lupinus** (Narodowe Centrum Nauki, nr 2011/03/B/NZ2/01420; 2012-2016) i częściowo w ramach projektu HARMONIA 7 pt. *Mechanizmy leżące u podstaw ewolucji genomów roślinnych, dywersyfikacji i specjacji* (Narodowe Centrum Nauki, nr 2015/18/M/NZ2/00422; 2016-2020), których byłam/jestem kierownikiem. Będąc kierownikiem projektu HARMONIA 7, rozpoczęłam współpracę z prof. Scottem A. Jacksonem (University of Georgia, Athens, USA), który posiada wybitne osiągnięcia naukowe w analizach ewolucji genomów roślinnych z zastosowaniem najnowocześniejszych narzędzi bioinformatyki, biologii i cytogenetyki molekularnej oraz epigenetyki.

CEL 1: Kierunek przemian chromosomów w toku ewolucji łubinów Starego Świata

Porównawcze mapowanie genomów metodą FISH przyczyniły się do identyfikacji różnych rearanżacji chromosomów, np. duplikacji segmentów chromosomów i inwersji w obrębie chromosomów homeologicznych u *Glycine max* i *Phaseolus vulgaris* (Pagel i in., 2004; Lin i in., 2010), czy dysploidii u *Phaseolus vulgaris* (Fonsêca i in., 2016)

W badaniach wykorzystałam dwanaście gatunków łubinów, obejmujących trzy gatunki uprawne wraz z ich dzikimi formami: *L. angustifolius* ($2n=40$) i *L. cryptanthus* ($2n=40$), *L. luteus* ($2n=52$) i *L. hispanicus* ($2n=52$) oraz *L. albus* ($2n=50$) i *L. graecus* ($2n=52$), a także inne gatunki dzikie, takie jak: *L. micranthus* ($2n=52$), *L. atlanticus* ($2n=38$), *L. digitatus* ($2n=36$), *L. cosentinii* ($2n=32$), *L. pilosus* ($2n=42$) i *L. palaestinus* ($2n=42$). Celem badań było określenie: (i) zróżnicowania chromosomów w obrębie wszystkich łubinów Starego Świata, (ii) kierunków przemian chromosomów oraz (iii) czy istnieje model ewolucji kariotypu wspólny dla łubinów.

Dla przeprowadzenia dokładnego mapowania cytogenetycznego, kluczowym etapem było opracowanie dokładnego idiogramu, opartego o przypisanie mapy chromosomów (Wyrwa i in., 2016) i pseudomolekuł *L. angustifolius* (Hane i in., 2017). Następnie, na podstawie porównawczego mapowania genomów metodą BAC-FISH, wyróżniłam cztery grupy chromosomów odzwierciedlających zróżnicowany wzór po BAC-FISH, w odniesieniu do chromosomów gatunku referencyjnego. Na podstawie zróżnicowanych wzorów lokalizacji klonów BAC w chromosomach badanych gatunków wnioskowano o zachodzących przemianach chromosomowych. Przykładowo, jeden chromosom Lang 06 niosący trzy klony 44J16, 76K16 i 80B11 w ramieniu A i dwa klony 51D03 i 127N17 w ramieniu B był reprezentowany przez różną liczbę chromosomów u spokrewnionych łubinów. Klony z ramienia A hybrydyzowały do jednego chromosomu *L. luteus* (Llut06), *L. albus* (Lalb06) i *L. graecus* (Lgra06). Natomiast, klon 51D03 z ramienia B, zidentyfikowałam w innym chromosomie tych trzech gatunków, określonym odpowiednio jako Llut06', Lalb06' i Lgra06'. Wśród 52 klonów BAC użytych do analiz porównawczych wyróżniono: (i) zestaw markerów chromosomów dla każdego badanego gatunku, (ii) markery zmian przemian chromosomowych, a także (iii) markery pozwalające na rozróżnienie gatunków uprawnych od ich dzikich form.

W pracy zaproponowaliśmy **model przemian chromosomowych** wyjaśniający zmiany w liczbie i/lub strukturze chromosomów. Założono, że mechanizmy kształtujące te różnice zachodziły w wyniku utraty lub wstawienia sekwencji DNA na drodze licznych mutacji typu delecja, insercja, duplikacja. Dodatkowo, rearanżacje w obrębie chromosomów lub między nimi typu insercja lub translokacja, wpłynęły na zróżnicowanie chromosomów (Schubert, 2007). Na tej podstawie uznano, że co najmniej cztery typy (I–IV) rearanżacji chromosomowych występowały u łubinów. Przykładowo, zmiany chromosomowe typu II mogły obejmować translokację ramienia A i ramienia B, polegającą na przemieszczeniu się tych odcinków do trzech chromosomów. W wyniku tego procesu zidentyfikowano dwa chromosomy posiadające ramię A i jeden chromosom niosący ramię B. Jednak nie można wykluczyć, że powstanie trzech chromosomów mogło być efektem translokacji obejmującej obydwie ramiona chromosomów, a późniejsza duplikacja chromosomu niosącego sekwencje ramienia A doprowadziła do powstania trzeciego chromosomu. Należy też wziąć pod uwagę inne złożone zmiany, np. związane z pęknięciem chromosomu, powstaniem dwóch nowych chromosomów, translokacją ramienia A lub duplikacją chromosomu niosącego ramię A, które mogły mieć udział w ukształtowaniu się trzech chromosomów. Ten typ przemian chromosomowych obserwowano u *L. pilosus* (Lpil06, Lpil06', Lpil06'') i *L. digitatus* (Ldig17,

Ldig17', Ldig17"). Zróżnicowanie chromosomów łubinów prawdopodobnie wynika z różnej organizacji genomu i stopnia pokrewieństwa ewolucyjnego między badanymi łubinami, a gatunkiem referencyjnym *L. angustifolius*. Warto zauważyć, że identyfikacja zmian chromosomowych nie była bezpośrednio związana z liczbą klonów użytych do mapowania porównawczego. Cztery klony były wystarczające do wykrycia zmian strukturalnych odpowiadającym chromosomom Lang03 i Lang11 we wszystkich łubinach, podczas gdy lokalizacja czterech klonów w chromosomach odpowiadającym chromosomowi Lang08 pozwoliła na wizualizację zmian strukturalnych wyłącznie u *L. micranthus*. Należy podkreślić, że każdy chromosom mógł ulec swoistym i niezależnym zmianom ewolucyjnym.

W pracy przedstawiliśmy **hipotezę dotyczącą przebiegu ewolucji kariotypów** łubinów, opartą na redukcji chromosomów z $2n=52$ do $2n=36$. Gatunki o liczbie chromosomów $2n=52$ mogły wyewoluować z gatunków 'ancestralnych' o liczbie chromosomów $2n=54$. Gatunki posiadające niższą liczbę chromosomów prawdopodobnie przeszły trzy rundy duplikacji całego genomu (ang. Whole Genome Duplication, WGD) w wyniku których wyewoluowały gatunki o liczbie chromosomów $2n=48$, $2n=42$ i $2n=36$, a towarzyszące im zdarzenia aneuploidii doprowadziły do ukształtowania się kariotypów o liczbie chromosomów $2n=52$, 50, 40, 38, 32 takich jak *L. luteus* ($2n=52$), *L. albus* ($2n=50$), *L. angustifolius* ($2n=40$), *L. atlanticus* ($2n=38$), *L. cosentinii* ($2n=32$). Zaproponowaliśmy również hipotezę, że podstawowa liczba chromosomów u łubinów Starego Świata wynosi $x=6$. Idea ta jest zgodna z wynikami wielu badań łubinów Nowego Świata, u których podstawowa liczba chromosomów wynosi również $x=6$. Pomimo, że porównawcze analizy filogenetyczne roślin strączkowych wskazują, że podstawowa liczba chromosomów w pleminie Genisteae wynosi $x=9$ (Cannon i in., 2015).

W prowadzonych badaniach wskazaliśmy, że zarówno dysploidia, jak i aneuploidia stanowią ważne procesy w ewolucji łubinów, szczególnie biorąc pod uwagę procesy poliploidyzacji (Steele i in., 2010; Doyle, 2012). Co jest ważne, mechanizmy ewolucyjne typu allopoliploidyzacja, mogą być unikalne dla łubinów Starego Świata (Drummond, 2008). Zmiany chromosomowe u łubinów, będące wynikiem translokacji chromosomów, można wyjaśnić w podobny sposób jak te zidentyfikowane u *Phaseolus vulgaris* i *Vigna unguiculata* (Vasconcelos i in., 2015). Podczas, gdy aberracje chromosomowe związane z pęknięciem chromosomu i fuzją chromosomów, które mogą prowadzić do redukcji chromosomów, wymagają dalszych analiz, np. opartych o pulę markerów centromerowych. Zjawisko dysploidii, powstałej w wyniku fuzji centrycznych jest powszechnie zobrażowane u traw np. w rodzaju *Brachypodium* (Wolny i in., 2011; Lusinska i in., 2018), ale także u Brassicaceae (Lysak i in., 2016). U roślin strączkowych fuzję chromosomów zaobserwowano tylko

u *Phaseolus leptostachyus* (Fonsêca i in., 2016). Z drugiej strony, należy też uwzględnić procesy aneuploidii. Wykazano, że aneuploidia występowała głównie we wczesnych liniach ewolucyjnych Papilionoid, do których należą łubiny (Doyle, 2012). Dane literaturowe potwierdzają występowanie aneuploidów u strączkowych, m.in. w rodzaju *Arachis* (Leal-Bertioli i in., 2015) i *Lathyrus* (Talukdar, 2012).

Wnioski:

Kariotypy łubinów podlegały różnym i licznym rearanżacjom chromosomowym. Zróżnicowanie w liczbie i strukturze chromosomów łubinów jest konsekwencją zdarzeń ewolucyjnych – poliploidyzacji, i towarzyszącej jej aneuploidii. Redukcja liczby chromosomów stanowi podstawową tendencję przemian chromosomowych.

Badania genomów łubinów na poziomie cytologicznym, są wymagające, przede wszystkim ze względu na liczne i małe chromosomy o zbliżonej morfologii (symetryczne kariotypy) i ograniczone zasoby genomowe. Wyniki badań ustanowiły bazę zasobów cytogenomowych do dalszych analiz struktury i zróżnicowania genomów łubinów. Opracowane narzędzia tj.: cytogenomiczna mapa *L. angustifolius* (podpunkt 1, poniżej) i markery chromosomowe (podpunkt 2) stanowią łącznik w badaniach prowadzących do zrozumienia procesów ewolucyjnych i adaptacyjnych łubinów. Wybór trzech gatunków referencyjnych do dalszych badań mechanizmów ewolucyjnych u łubinów (podpunkt 3), w przyszłości może przełożyć się na prowadzenie badań w innej skali detekcji zdarzeń ewolucyjnych, podobnie jak u soi i fasoli zwyczajnej (Lin i in., 2010) lub *Arabidopsis thaliana*, a także u innych gatunków Brassicaceae (Mandáková i in., 2013, 2018).

1) Cytogenomiczna mapa *L. angustifolius* jako podstawowe narzędzie w badaniach porównawczych

Kariotypy referencyjne okazały się kluczowym narzędziem wykorzystywanym w porównawczych analizach mapowania chromosomów u roślin, np. wśród rodzajów roślin strączkowych u *Arachis* (Zhang i in., 2016), *Glycine* (Findley i in., 2010) i *Phaseolus* (Fonsêca i in., 2010). W pracy, w celu precyzyjnego przypisania chromosomów do pseduomolekuł, użyto sekwencji całych klonów BAC (ang. Whole BAC Sequences, WBS). W ramach przedstawianych badań, uzyskaliśmy sekwencje dla 22 klonów, wykorzystując metodę sekwencjonowania długich odczytów (PacBio) i platformę NGS (Illumina). Nowo otrzymane sekwencje WBS wraz z innymi sekwencjami BAC dostępnymi dla łubinów w bazie danych NCBI, **poszerzyły zasoby cytogenomiczne** i ustanowiły wydajny zestaw narzędzi do integracji

mapy chromosomów i pseudomolekuł. Dotychczas, przypisanie grup sprzężeń do chromosomów *L. angustifolius* zostało przeprowadzone przy wykorzystaniu przede wszystkim sekwencji końców klonów BAC (Wyrwa i in., 2016). Ostatecznie, 13 chromosomów przypisałam do pseudomolekuł *L. angustifolius*, zgodnie z wcześniejszymi wynikami (Lesniewska i in., 2011; Wyrwa i in., 2016). Siedem chromosomów zostało przypisanych do innych pseudomolekuł lub przypisano do nich kolejne markery BAC niż wynikało to z integracji chromosomów i mapy sprzężeń opublikowanej przez Wyrwa i in. (2016). Integracyjne mapowanie pozwoliło także na zmapowanie klonów dotąd nieprzypisanych do grupy sprzężeń, np. włączenie dotychczas nieprzypisanej grupy sprzężeń (Cluster-2), zawierającej markery cech użytkowych, tj. wczesności kwitnienia do pseudomolekuły NLL20.

Ponieważ liczba sekwencjonowanych genomów gwałtownie rośnie, istnieje potrzeba stworzenia odpowiednich narzędzi do ustanowienia wysokiej jakości genomów referencyjnych. W przypadku niektórych złożonych genomów, sekwencjonowanie klonów BAC nadal pełni pomocną funkcję przy składaniu genomów sekwencjonowanych metodami NGS (ang. Next Generation Sequencing) (Visendi i in., 2016). FISH, stanowi dodatkowy ‘punkt kontrolny’ w procesie składaniu genomów, nawet jeśli inne techniki porównawcze, takie jak mapowanie optyczne metodą BioNano i sekwencjonowanie Hi-C zostały użyte do precyzyjnego składania genomów (Kolmogorov i in., 2018). W omawianej pracy wykazano, że integracja sekwencji całego genomu i mapy chromosomów jest **skuteczną i komplementarną strategią badawczą** w określaniu poprawności i jakości złożonego genomu *L. angustifolius*. Jest to o tyle istotne, że wśród łubinów przybywa gatunków dla których jest dostępna sekwencja całego genomu. Drugim gatunkiem dla którego dostępna jest sekwencja całego genomu jest *L. albus* (Hufnagel i Peret, 2019, <https://pag.confex.com/pag/xxvii/meetingapp.cgi/Paper/33699>), a genom *L. luteus* jest w trakcie sekwencjonowania (Udall, 2018, informacja ustna).

2) Markery chromosomowe dla konstruowania idiogramów łubinów

Rozwój różnych narzędzi badawczych, takich jak mapy genetyczne, cytogenetyczne, markery chromosomów jest kluczowe dla syntenicznego poznania i zrozumienia ewolucji genomów łubinów. Spośród 52 klonów uznanych jako markery chromosomów *L. angustifolius* opracowano zestaw markerów dla każdego łubinu: *L. cryptanthus* – 41, *L. luteus* – 25, *L. hispanicus* – 19, *L. albus* – 25, *L. graecus* – 24, *L. micranthus* – 26, *L. atlanticus* – 25, *L. digitatus* – 19, *L. cosentinii* – 22, *L. pilosus* – 27 i *L. palaestinus* – 24 markerów.

Baza ta stanowi platformę dla wielu kierunków badawczych o charakterze podstawowym i aplikacyjnym: i) w projektowaniu markerów genetycznych (np. SSR) podczas tworzenia map genetycznych; ii) w konstruowaniu kariotypów dla uprawnych i dzikich gatunków, np. pula markerów dla *L. cosentinii* ($2n=32$); iii) w integracji chromosomów i map genetycznych/pseudmolekuł; iv) w rozróżnianiu gatunków uprawnych i odpowiadającym im form dzikich.

3) *L. digitatus*, *L. pilosus* i *L. palaestinus* jako gatunki referencyjne w badaniach ewolucyjnych

Na podstawie wyników cytogenetycznych, zaproponowaliśmy przyjęcie trzech gatunków: *L. digitatus* ($2n=36$), *L. pilosus* ($2n=42$) i *L. palaestinus* ($2n=42$), jako gatunków modelowych do śledzenia ewolucji chromosomów u łubinów. Gatunki te mają podstawową liczbę chromosomów $x=6$. Analizy filogenetyczne wykazały, że *L. digitatus* i *L. palaestinus* należą do jednych z najmłodszych gatunków łubinów, które powstały około 0,5 mlt. Natomiast, *L. pilosus* wyewoluował około 3 mlt (Drummond i in., 2012). Chociaż *L. pilosus* i *L. palaestinus* posiadają tę samą liczbę chromosomów, to charakteryzują się zróżnicowaniem w kariotypach i różnym czasem dywergencji. Przypuszczamy, że *L. digitatus* i *L. palaestinus* przeszły co najmniej jedną wspólną rundę WGD, podczas gdy *L. pilosus* mógł podlegać innym zdarzeniom WGD.

Organizacja genomu kontrolowana jest na poziomie genetycznym, ale także epigenetycznym. Badania cytogenetyczne przedstawiły obraz wysokiego zróżnicowania struktury genomów łubinów na poziomie chromosomów. Natomiast, w jaki sposób struktura i dynamika chromatyny wpływa na zróżnicowanie genomów łubinów, ze szczególnym uwzględnieniem modyfikacji histonów i metylacji genomowego DNA było zadaniem przedstawionym w kolejnej publikacji.

P3: Susek K.^{*,‡}, Braszewska-Zalewska A.[‡], Bewick A.J., Hasterok R., Schmitz R.J., Naganowska B. (2017). Epigenomic diversification within the genus *Lupinus*. *PlosOne* 22;12(6):e0179821.

Badania te prowadziłam w ramach projektu OPUS 2 pt. *Cytomolekularny wgląd w genomy Lupinus* (Narodowe Centrum Nauki, nr 2011/03/B/NZ2/01420; 2012-2016). Prace były prowadzone we współpracy z zespołem prof. dr. hab. Roberta Hasteroka (Uniwersytet Śląski w Katowicach), który jest uznanym ośrodkiem badań epi- i cytogenetycznych. Jako kierownik

projektu nawiązałam współpracę z zespołem dr. Roberta Schmitza (University of Georgia), który prowadzi unikatowe i opracowuje pionierskie rozwiązania metodyczne w zakresie analiz epigenetycznych.

Badania zmienności epigenetycznej na poziomie chromosomów są szczególnie interesujące w przypadku gatunków uznanych za poliploidy (Wendel i in., 2016). Prezentowane wyniki badań są jedynymi dla łubinów i mogą być pomocne w dyskusji o roli zmian epigenetycznych. Celem badań było opracowanie profili modyfikacji epigenetycznych jako markerów zróżnicowania funkcjonalnego genomów łubinów. Interesującym aspektem było scharakteryzowanie profili metylacji genomowego DNA pomiędzy uprawnymi, a dzikimi łubinami co pośrednio obrazuje zmiany genomowe powstałe w wyniku ewolucji i/lub adaptacji.

CEL 1: Modyfikacje chromatyny na poziomie chromosomów

Modyfikacje chemiczne chromatyny obejmujące zarówno histony, jak i DNA są wysoce konserwatywne wśród eukariontów, lecz profile tych modyfikacji zwykle różnią się w zależności od gatunku. Związane jest to głównie z różnicami w organizacji genomu jądrowego, ale także czynnikami środowiskowymi.

W pracy przedstawiliśmy zróżnicowanie we wzorach modyfikacji histonów charakterystycznych dla regionów euchromatynowych (dimetylacja reszty lizyny 4 histonu H3, H3K4me2) i heterochromatynowych (dimetylacja reszty lizyny 9 histonu H3, H3K9me2) oraz metylacji DNA (metylacja cytozyny, 5mC) w chromosomach trzech uprawnych łubinów i *M. truncatula*. Zastosowanie immunocytochemicznych umożliwiło mi zwizualizować **różnice w modyfikacjach epigenetyczne**. Wykazano, że modyfikacja H3K4me2 występuje w terminalnych odcinkach chromosomów u uprawnych łubinów *L. angustifolius*, *L. albus* i *L. luteus* oraz u *M. truncatula*, co jest zgodne z obserwacjami u większości badanych roślin (Fuchs i in., 2006). Wzór rozmieszczenia modyfikacji H3K4me2 potwierdził także, że regiony te są bogate w geny zarówno u *L. angustifolius*, jak i *M. truncatula*, co wcześniej zostało zasugerowane – Kulikova i in. (2001) i Lesniewska i in. (2011). Interesujące jest, że u *L. albus* i *L. luteus* modyfikacja H3K4me2 była zlokalizowana w odcinkach terminalnych, ale tylko jednego ramienia wszystkich chromosomów. Badania kolejnych modyfikacji histonu H3 – acetylacja reszty lizyny 18 histonu H3 (H3K18ac) u *L. albus* i acetylacja reszty lizyny 16 histonu H4 (H4K16ac) u *L. luteus* potwierdziły występowanie wzoru podobnego dla modyfikacji H3K4me2. Dotychczas, taki wzór modyfikacji histonu H3K4me2 nie został zidentyfikowany w świecie roślin.

Modyfikacja H3K9me2 może być skorelowana z wielkością genomu jądrowego u roślin. Jednak, u *M. truncatula*, pomimo małego genomu, obserwowano wzór lokalizacji sygnałów charakterystyczny dla gatunków o większym genomie (2C DNA>1000 Mpz), np. taki jaki u *Zea mays* (Shi i Dawe, 2006). Z kolei, u gatunków cechujących się małym genomem (2C DNA<1000 Mpz) modyfikacja H3K9me2 występuje w perycentrycznych i centromerowych odcinkach chromosomów (Houben i in., 2003). Tymczasem, u *L. angustifolius* (2C DNA=1890 Mpz) i *L. albus* (2C DNA=1100 Mpz) profile dimetylacji H3K9me2 obejmowały terminalne odcinki ramion chromosomów, podobnie do profilu modyfikacji H3K4me2. Przypuszczamy, że odcinki heterochromatyny mogą występować pomiędzy blokami euchromatyny u łubinów, podobnie jak u *A. thaliana* (Feng i Jacobsen, 2011). Zaskakujące jest to, że modyfikacja H3K9me2 nie została zidentyfikowana u *L. luteus*, gatunku charakteryzującego się największym genomem (2C DNA =2440 Mpz) wśród łubinów Starego Świata. Taki wynik może przemawiać za wykształceniem się **złożonego systemu organizacji chromatyny** u *L. luteus*.

W pracy przeprowadziliśmy analizy metylacji DNA w chromosomach uprawnych gatunkach i *M. truncatula*, jako gatunku modelowego. Różnice w profilach 5mC mogą wynikać z jakościowej (intensywność sygnałów fluorescencyjnych) i ilościowej (procent 'wyznakowanych' regionów chromosomów ulegającym metylacji DNA) organizacji DNA. Złożone mechanizmy towarzyszące procesom metylacji DNA mogą być odpowiedzialne za utrzymanie metylacji DNA i np. prowadzić do wyciszenia transpozonów DNA w niektórych chromosomach. Podczas gdy, te same sygnały wyciszające mogą być niewystarczające dla inicjacji metylacji DNA i wyciszenia tych samych sekwencji w pozostałych chromosomach tej samej komórki roślinnej (Zilberman i Henikoff, 2004).

Wnioski:

Profile modyfikacji histonów ujawniły unikatową i specyficzną organizację epigenomu u łubinów. Ponadto, zróżnicowane wzory metylacji DNA mogą świadczyć o licznych zdarzeniach reorganizacji genomu podczas ich ewolucji, np. związanych z amplifikacją sekwencji powtarzalnych, szczególnie u *L. luteus*.

CEL 2: Metylacja DNA na poziomie sekwencji genomów łubinów

Dotychczasowe badania metylomu pokazały, że metylacja DNA jest procesem powszechnie występującym u roślin, lecz wykazującym się wysokim zróżnicowaniem pomiędzy badanymi gatunkami (Schmitz i in., 2013; Li i in., 2014; Seymour i in., 2014). Porównawcze wyniki

wysokoprzepustowego sekwencjonowania genomowego DNA pozwoliły na identyfikację globalnego poziomu metylacji DNA u trzech uprawnych i czterech dzikich gatunków łubinów (*L. cosentinii*, *L. digitatus*, *L. micranthus* i *L. pilosus*). Profilowanie metylacji DNA ujawniło globalne różnice we wzorach metylacji DNA w układzie symetrycznym (CG i CHG) i niesymetrycznym (CHH). Na podstawie poziomu metylacji DNA w wariancie sekwencyjnym CG, podzieliłam analizowane łubiny na dwie grupy. Pierwsza obejmowała gatunki o najwyższym poziomie metylacji (35%) – *L. albus* i *L. luteus*. Natomiast do drugiej grupy zaliczyłam gatunki o porównywalnym poziomie metylacji DNA – *L. angustifolius*, *L. digitatus*, *L. micranthus* (29%), *L. pilosus* (28%) i *L. cosentinii* (27%). Analizy 5mC w układzie sekwencyjnym CHG pokazały, że najwyższy poziom tej modyfikacji występował u gatunków uprawnych – *L. luteus* (40%), *L. albus* (36%) i *L. angustifolius* (31%). U pozostałych dzikich łubinów poziom metylacji 5mC w wariancie CHG obejmował zakres od 25% do 23%. Natomiast poziom metylacji 5mC w kontekście CHH był najniższy wśród badanych układów, co jest typowe dla większości roślin (Niederhuth i in., 2016; Chen i in., 2015; Kim i in., 2015).

Należy podkreślić, że najwyższy poziom 5mC we wszystkich trzech układach nukleotydowych występował u gatunków uprawnych (*L. albus* i *L. luteus*), podczas gdy najniższe wartości obserwowałam u dzikiego gatunku, *L. cosentinii*. Zjawisko to może być związane ze specyficzną organizacją powtarzających się sekwencji i/lub swoistym upakowaniem heterochromatyny u gatunków uprawnych (Schmitz i in., 2011; Dubin i in., 2015). Zróżnicowanie we wzorach 5mC może być także konsekwencją procesów poliploidyzacji i związanych z nimi złożonymi zmianami w mechanizmach regulacji genomów (Jackson i Chen, 2010; Jordan i Schmitz, 2016).

Wnioski:

Złożone zdarzenia poliploidyzacyjne u łubinów mogą być skorelowane ze zmiennością wzorów modyfikacji chromatyny. Ponadto, procesy hodowlane (udomowienia) i adaptacyjne mogły doprowadzić do wykształcenia się specyficznej maszynarii epigenetycznej u uprawnych gatunków łubinów.

Podsumowując, wyniki moich publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego umożliwiają pełniejsze zrozumienie organizacji chromosomów łubinów oraz udział rearanżacji chromosomowych i modyfikacji epigenetycznych w kształtowaniu genomów łubinów.

Za najważniejsze osiągnięcie uważam określenie przemian chromosomowych i zaproponowanie modelu ewolucji kariotypów w kierunku redukcji chromosomów, w wyniku złożonych procesów poliploidyzacji i towarzyszącym im zdarzeniom aneuploidii.

Ponadto, w powyższym cyklu badań przedstawiono:

- 1) zróżnicowanie w strukturze chromosomów łubinów;
- 2) przemiany chromosomowe, takie jak delecja/insercja oraz translokacja i fuzja-fizja chromosomowa, jako główne zdarzenia prowadzące do zmiany struktury i liczby chromosomów u łubinów;
- 3) markery chromosomów *L. angustifolius* jako markery chromosomów spokrewnionych gatunków i narzędzia do identyfikacji złożonych rearanżacji chromosomowych;
- 4) zróżnicowanie w profilach modyfikacji histonów u uprawnych łubinów;
- 5) różnice w metylacji DNA pomiędzy uprawnymi i dzikimi gatunkami łubinów.

Dodatkowo, wyniki badań wzbogaciły infrastrukturę badawczą dla łubinów tj. kompleksowa zintegrowana mapa genomu *L. angustifolius*, zestaw markerów chromosomowych, dane sekwencyjne klonów BAC, sekwencje metylacji DNA. Badanie te, prowadziłam w ramach dwóch własnych projektów badawczych, sfinansowanych przez Narodowe Centrum Nauki. Realizowałam je w ramach współpracy krajowej i zagranicznej.

W podsumowaniu warto podkreślić, że wyniki omówionych prac wyznaczyły kolejne kierunki badawcze, które mogą wpłynąć na rozwój genomiki łubinów i przyczynić się do postępu prac hodowlanych. Staż naukowy w zespole prof. S.A. Jacksona, a także wcześniejsze wizyty naukowe w ramach *SKILLS – FNP Mentoring Programme* (2015) pozwoliły mi na zapoznanie się i zaplanowanie kariery naukowej w kontekście badań podstawowych, ich zastosowaniem w pracach badawczo-rozwojowych oraz koniecznością integracji interdyscyplinarnych badań w celu utworzenia platformy badawczej w nowoczesnych procesach udoskonalenia hodowli roślin uprawnych.

Badania cytogenetyczne wskazały idee związane z:

- 1) poszukiwaniem nowych rozwiązań badawczych w celu prześledzenia szczegółowych rearanżacji w obrębie danego chromosomu. Zastosowanie zaawansowanej techniki ‘oligo-paint’-FISH pozwoli na wykrycie przemian chromosomowych na wyższym poziomie czułości mapowanie chromosomów (projekt NCN PRELUDIUM 12, nr 2016/23/N/NZ2/01509; 2017-2019);

- 2) zrozumieniem mechanizmów ewolucyjnych w oparciu o kompleksowe analizy transkryptomów łubinów Starego i Nowego Świata, a także wybranych gatunków z plemienia Genisteae. Badania te, prowadzone są na podstawie analiz zmian w profilu ekspresji, utraty/duplikacji poszczególnych genów, konwersji genów prowadzących do sub- lub neo-funkcjonalizacji genów (projekt NCN HARMONIA 7, nr 2015/18/M/NZ2/004221; 2016-2020);
- 3) zrozumieniem architektury genetycznej i jej dynamiki regulacyjnej, leżących u podstaw zmienności wielkości nasion w celu stworzenia modelu ewolucyjnego i udomowienia prowadzącego do kształtowania się dużych nasion. Badanie te przedstawiłam we wniosku projektu OPUS 16 pt. *Odkrywanie genetycznych i epigenetycznych mechanizmów związanych ze zmiennością wielkości nasion u roślin strączkowych w celu zrozumienia procesów ewolucyjnych zachodzących podczas udomowienia* (NCN, nr rej. 2018/31/B/NZ9/03325; projekt w trakcie ewaluacji). Złożyłam także projekt we współpracy z naukowcami z Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology (Poczdam, Niemcy) i University of Georgia (Athens, USA.), w ramach konkursu *Marie Skłodowska-Curie Actions Individual Fellowships*, Unia Europejska, nr 845080, który został nagrodzony *Seal of Excellence*, lecz z powodu ograniczonych środków nie otrzymał finansowania;

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Moje zainteresowania badawcze obejmują dwa główne nurty badawcze. Pierwszy z nich dotyczy badań związanych z genomiką **gatunku uprawnego łubinu wąskolistnego** (*Lupinus angustifolius*) i ewolucją w obrębie rodzaju *Lupinus*. Drugim kierunkiem badawczym, podjętym podczas ponad trzyletniej pracy na Uniwersytecie Śląskim w Katowicach, są badania **genomu rośliny modelowej** dla traw strefy klimatu umiarkowanego – kłosownicy dwukłoskowej (*Brachypodium distachyon*).

Tematyka badawcza realizowana w oparciu o gatunki z rodzaju *Lupinus*

Podczas pracy doktorskiej rozpoczęłam badania związane ze strukturą genomu łubinów. Studia doktoranckie podjęłam na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Badania realizowałam w Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu w Pracowni Genomiki Strukturalnej, kierowanej przez prof. dr. hab. Bogdana Wolko. Kontynuowałam je po obronie pracy doktorskiej podczas pracy w Uniwersytecie Śląskim w Katowicach – na

Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska w Katedrze Anatomii i Cytologii Roślin. Po zakończeniu pracy (stażu) w Uniwersytecie Śląskim w Katowicach rozwijam je w Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu, w Zakładzie Genomiki, w Zespole Struktury i Funkcji Genów, kierowanym przez prof. dr hab. Barbarę Naganowską.

Badania o charakterze podstawowym miały na celu poznanie struktury genomu łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius*), jako gatunku referencyjnego. Prace badawcze prowadzone w ramach 6. Programu Ramowego Unii Europejskiej Grain Legumes Intergrated Project (GLIP) pt. *New strategies to improve grain legumes for food and feed* (FP6-2002-FOOD-1-506223) obejmowały genetyczne mapowanie porównawcze siedmiu gatunków strączkowych. Celem projektu było opracowanie rozwiązań badawczych zmierzających do zwiększenia udziału roślin strączkowych w rolnictwie (<http://www.pcg.in.org/GLIP/GLIP.htm>). Moje badania eksperymentalne pozwoliły na opracowanie zestawu markerów genetycznych dla *L. angustifolius* w oparciu o sekwencyjne bazy danych EST (ang. Expressed Sequence Tags) oraz TC (ang. Tentative Consensus) dla gatunku modelowego dla roślin strączkowych *Medicago truncatula* oraz dla *Pisum sativum*. Markery umożliwiły wzbogacenie mapy genetycznej *L. angustifolius*, przeprowadzenie mapowania porównawczego genomów strączkowych oraz oszacowanie syntenii pomiędzy *L. angustifolius* i *M. truncatula*. Prace te były kontynuowane po zakończeniu mojej pracy doktorskiej we współpracy z dr Matthew Nelsonem (University of Western Australia, Perth, Australia), co zaowocowało opracowaniem pierwszej kompleksowej mapy genetycznej genomu *L. angustifolius* (Nelson i in., 2010). Mapa genetyczna ustanowiła **fundamentalne narzędzie badawcze** dla późniejszych analiz genomu łubinu wąskolistnego, włączając prace związane z przypisaniem chromosomów do grup sprzężeń (Wyrwa i in. 2016), a także sekwencjonowanie genomu *L. angustifolius* (Hane i in., 2017). Dodatkowo, markery STS wykorzystano do **identyfikacji regionów genomu** *L. angustifolius* związanych z **loci cech ilościowych QTL** (ang. Quantitative Trait Loci) m.in. wczesność kwitnienia, wielkość nasion (Boersma i in., 2008).

Jedną z podstawowych przeszkód ograniczających intensyfikację upraw łubinów w Polsce i na świecie są choroby wywoływane przez grzyby patogeniczne. Jako wykonawca dwóch projektów badawczych MNiSW, kierowanych przez prof. dr. hab. Bogdana Wolko, uczestniczyłam w badaniach zmierzających do określenia regionu/regionów genomu łubinu wąskolistnego związanych z odpornością na choroby – antraknozę i brunatną plamistość łodyg, wywoływanych odpowiednio przez grzyby patogeniczne *Colletotrichum lupini* i *Diaporthe toxica*. W tym celu wykorzystano klony pochodzące z biblioteki BAC genomu jądrowego (Kasprzak i in., 2006), zawierające sekwencje sprzężone z locus odporności na grzyby

patogeniczne. Markery BEST, opracowane na podstawie sekwencji końców klonów BAC, zmapowałam w kilku grupach sprzężeń u *L. angustifolius*. Co zasugerowało, że odporność na grzyby patogeniczne może być związana z więcej niż jednym regionem genomu *L. angustifolius*. W celu potwierdzenia wyników mapowania genetycznego przeprowadziłam mapowanie genomu *L. angustifolius* metodą FISH, wykorzystując klony BAC jako sondy molekularne. Integracyjne mapowanie genomu wskazało, że odporność na grzyby patogeniczne może być związana z więcej niż jednym regionem genomu *L. angustifolius*. Zweryfikowano wcześniejsze przypuszczenia o jednogenowym charakterze dziedziczenia odporności na niektóre choroby powodowane przez grzyby patogeniczne.

Rozwój badań genetycznych i cytogenetycznych przyczynił się do podjęcia ambitnego zadania integracji mapy genetycznej i chromosomowej *L. angustifolius*. Badania trudne w realizacji, przede wszystkim ze względu na dużą liczbę ($2n=40$) małych i słabo zróżnicowanych pod względem morfometrycznym chromosomów, były skoncentrowane na opracowaniu markerów chromosomowo-specyficznych. Przeprowadzenie szeregu reakcji BAC-FISH, pozwoliło mi na otrzymanie puli dwunastu markerów chromosomów, umożliwiających ich jednoznaczną identyfikację. W konsekwencji, **przypisałam trzy grupy sprzężeń do chromosomów** (Lesniewska i in., 2011). Ustanowiło to podstawę do dalszych badań zmierzających do utworzenia kompletnej – zintegrowanej mapy genomu *L. angustifolius*.

Podczas realizacji pracy doktorskiej byłam wykonawcą w dwóch krajowych i jednym międzynarodowym projekcie badawczym. Badania te wykonywałam w ramach współpracy z zagranicznymi ośrodkami naukowymi: Murdoch University, Perth Australia, The University of Western Australia, Perth, Australia, Department of Agriculture and Food, Western Australia, Perth, Australia i Université de Rennes we Francji.

Wyniki moich badań zostały wyróżnione nagrodą przyznaną przez Fundację Uniwersytetu im. A. Mickiewicza – Poznański Park Naukowo Technologiczny *Stypendia dla najlepszych uczestników studiów doktoranckich w Wielkopolsce z zakresu nauk przyczyniających się do rozwoju strategicznych obszarów regionu*.

Po ukończeniu doktoratu, uczestniczyłam w integracyjnym mapowaniu genomu *L. angustifolius*. W wyniku analiz została utworzona **kompleksowa mapa chromosomów, przypisanych do grup sprzężeń** (Wyrwa i in., 2016). Jednocześnie rozpoczęłam badania związane ze organizacją i ewolucją genomów łubinów. Przemiany poliploidyzacyjne, związane przede wszystkim z duplikacją całego genomu, prowadzą do szeregu zmian w genomie

formującego się gatunku obejmujących m.in. redukcję wielkości genomu, redukcję liczby chromosomów oraz zmiany w poziomie ekspresji genów (Comai, 2000). Obecnie kieruję multidyscyplinarnym projektem badawczym (NCN HARMONIA 7), łączący analizy genetyczne, cytogenetyczne, transkryptomyczne i bioinformatyczne. Celem kierowanego projektu jest **poznanie procesów poliploidyzacyjnych**. Badania filogenetyczne z użyciem transkryptomów pozwoliły precyzyjnie określić czas dywergencji tych gatunków, a także zweryfikowały dotychczasowe relacje ewolucyjne pomiędzy łubinami. Badania prowadzone są we współpracy z zespołem prof. S.A. Jacksona (University of Georgia, Athens, USA). Partnerem w projekcie jest również prof. Colin Hughes (University of Zurich, Szwajcaria), wiodący specjalista w zakresie systematyki i filogenezy strączkowych, w szczególności łubinów 'Nowego Świata'. Wyniki badań zaprezentowałam podczas konferencji *Plant and Animal Genome XXVII Conference* (Susek i in., 2019, San Diego, USA <https://pag.confex.com/pag/xxvii/meetingapp.cgi/Person/54808>).

Opracowana genowa platforma badawcza, w oparciu o transkryptomy dla wszystkich gatunków łubinów Starego Świata wraz z ich formami botanicznymi i ośmiu gatunków z plemienia Genisteae, stanowi źródło wiedzy o genach o zróżnicowanym profilu ekspresji i genach tkankowo-specyficznych. Wysokiej jakości transkryptomy, jako **innowacyjne narzędzia** pozwolą zrozumieć ewolucyjne procesy zróżnicowania łubinów, a także poznać mechanizmy różnych procesów biologicznych – ważnych w udoskonalaniu łubinów i roślin innych strączkowych. Część wyników została przedstawiona we wniosku projektu pt. *Intelligent Collections of Food-Legume Genetic Resources for European Agrofood Systems* nr 862862 w konkursie Genetic resources and pre-breeding communities SFS-28-2018-2019-2020 ramach programu Horyzont 2020 (projekt w drugim etapie ewaluacji). W złożonym projekcie zaproponowano mi pełnienie funkcji koordynatora zadania badawczego dotyczącego genomiki łubinów.

Tematyka badawcza realizowana w oparciu o gatunki z rodzaju *Brachypodium*

Wiele badań dotyczących poznania struktury i funkcji genomu roślin użytkowych opiera się na wykorzystaniu organizmów modelowych. *Brachypodium distachyon*, jako organizm modelowy dla traw strefy klimatu umiarkowanego jest doskonałym narzędziem w kompleksowych badaniach podstawowych, służącym lepszemu poznaniu i zrozumieniu wielu istotnych procesów biologicznych u traw (Poaceae). Podczas pracy w Uniwersytecie Śląskim w Katowicach uczestniczyłam w analizach genomu jądrowego *B. distachyon* ($2n=10$)

z użyciem nowoczesnych metod biologii i cytogenetyki molekularnej. W ramach międzynarodowej współpracy przedstawiliśmy szeroki zakres badań, włączając analizy cytogenetyczne w których *B. distachyon* pełni funkcję gatunku modelowego (Mur i in., 2011).

Wykorzystanie metody FISH z wyselekcjonowanymi, specyficznymi dla poszczególnych chromosomów *B. distachyon* pulami klonów BAC o niskiej zawartości sekwencji powtarzalnych pozwoliło **po raz pierwszy na zastosowanie metody malowania chromosomów** (ang. Chromosome Painting) u roślin jednoliściennych. Badania pozwoliły na identyfikację i zwizualizowanie rearanżacji chromosomowych u *B. distachyon*, *B. stacei* ($2n=20$) oraz *B. hybridum* ($2n=30$) (Idziak i in., 2011). Późniejsze porównawcze badania cytogenetyczne w obrębie tych trzech gatunków wskazały na liczne rearanżacje chromosomowe pomiędzy *B. distachyon*, *B. stacei*, z wyłączeniem *B. hybridum* (Lusinska i in., 2018). W celu poszerzenia wiedzy z zakresu organizacji genomów *Brachypodium* uczestniczyłam w analizach z zakresu biologii i filogenezy molekularnej. Wyniki prac wskazały na występowanie dysploidii w obrębie tego rodzaju. Co więcej, rezultaty badań zasugerowały **homoploidalne pochodzenie** gatunku modelowego, *B. distachyon* (Wolny i in., 2011).

Prace były prowadzone we współpracy naukowej z ośrodkami naukowymi w Wielkiej Brytanii: John Innes Centre, Norwich i Aberystwyth University. W zespole dr. Tima Langdona (Aberystwyth University) odbyłam kilka wizyt naukowych o łącznym czasie trwania około pięciu miesięcy, finansowanych przez Aberystwyth University, *British-Polish Young Scientists Programme* i *LLP Erasmus mobility*.

Współpraca z zespołem prof. dr. hab. Roberta Hasteroka jest kontynuowana w ramach projektu HARMONIA 7 pt. *Zmienność genetyczna i epigenetyczna w naturalnych populacjach modelowej trawy Brachypodium distachyon, a adaptacja do zróżnicowanych warunków środowiska*, kierowanego przez prof. dr. hab. Roberta Hasteroka (Narodowe Centrum Nauki, nr 2015/18/M/NZ2/0039420; 2016-2020). Jako promotor pomocniczy uczestniczę w opiece nad Doktorantem i przygotowaniu rozprawy doktorskiej pt. *Porównawcza analiza multiomiczna naturalnych populacji Brachypodium distachyon w celu poznania molekularnych mechanizmów adaptacji do zmiennych warunków środowiska*.

Podsumowując, w trakcie mojej kariery naukowej uczestniczyłam w realizacji projektów: dwóch finansowanych przez NCN, pięciu przez MNiSW/NCN, jednego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi i jednego przez Unię Europejską. Dotychczas, kierowałam dwoma

projektami finansowanymi przez NCN, które realizowano w ramach współpracy krajowej i zagranicznej.

Poza aktywnością badawczą prowadziłam zajęcia dydaktyczne na studiach I, II i III stopnia, szkoleniowe i popularno-naukowe. Byłam opiekunem naukowym prac magisterskich i promotorem prac licencjackich. Obecnie, jestem promotorem pomocniczym w dwóch przewodach doktorskich. Prowadziłam i organizowałam międzynarodowe warsztaty naukowe w kraju i za granicą. Jestem zaangażowana w organizację seminariów naukowych w Instytucie Genetyki PAN (2015-obecnie), organizację międzynarodowej konferencji naukowej *Third International Legume Society Conference* (Poznań, 21-24 maja 2019).

Chciałabym również podkreślić, że moje osiągnięcia naukowo-badawcze zostały wyróżnione nagrodami o zasięgu krajowym: (i) *Stypendium naukowe dla wybitnych młodych naukowców* przyznane przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (2014-2017), (ii) *Nagroda Polskiego Towarzystwa Genetycznego* za najlepszą publikację z zakresu genetyki (2016), (iii) *Nagroda indywidualna Rektora Uniwersytetu Śląskiego II stopnia* (2012), (iv) *Nagroda zespołowa Rektora Uniwersytetu Śląskiego I stopnia* (2011). Otrzymałam również międzynarodową Nagrodę Akademii Nauk krajów Grupy Wyszehradzkiej *Visegrad Group Academies Young Researcher Award 2013* w dziedzinie nauk rolniczych (2013).

Piśmiennictwo

- Boersma J.G. i in. (2008). Identification of quantitative trait loci (QTLs) influencing early vigour, height, flowering date, and seed size and their implications for breeding of narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Aust J Agric Res* 59, 527-535.
- Cannon S.B. i in. (2015). Multiple polyploidy events in the early radiation of nodulating and nonnodulating legumes. *Mol Biol Evol* 32, 193-210.
- Comai L. (2000). Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Mol Biol* 43, 387-399.
- Chen X. i in. (2015). Genome-wide DNA methylation profiling by modified reduced representation bisulfite sequencing in *Brassica rapa* suggests that epigenetic modifications play a key role in polyploid genome evolution. *Front Plant Sci* 6, 836.
- Doyle J.J. (2012). Polyploidy in Legumes In: *Polyploidy and Genome Evolution*, Red. P.S. Soltis & D.E. Soltis. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 147-180.
- Drummond C.S. (2008). Diversification of *Lupinus* (Leguminosae) in the western New World: derived evolution of perennial life history and colonization of montane habitats. *Mol Phylogenet Evol* 48, 408-421.
- Drummond C.S. i in. (2012). Multiple continental radiations and correlates of diversification in *Lupinus* (Leguminosae): testing for key innovation with incomplete taxon sampling. *Syst Biol* 61, 443-460.
- Dubin M.J. i in. (2015). DNA methylation in *Arabidopsis* has a genetic basis and shows evidence of local adaptation. *eLife* 4, e05255.
- Feng S., Jacobsen S.E. (2011). Epigenetic modifications in plants: an evolutionary perspective. *Curr Opin Plant Biol* 14, 179-186.
- Findley S.D. i in. (2010). A fluorescence *in situ* hybridization system for karyotyping soybean. *Genetics* 185, 727-744.
- Fonsêca A. i in. (2016). Speeding up chromosome evolution in *Phaseolus*: multiple rearrangements associated with a one-step descending dysploidy. *Chromosoma* 125, 413-421.
- Fonsêca A. i in. (2010). Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chromosome Res* 18, 487-502.
- Fonseca A., Pedrosa-Harand A. (2013). Karyotype stability in the genus *Phaseolus* evidenced by the comparative mapping of the wild species *Phaseolus microcarpus*. *Genome* 56, 335-343.

- Fuchs J. i in. (2006). Chromosomal histone modification patterns – from conservation to diversity. *Trends in Plant Science* 11, 199-208.
- Gao L.L. i in. (2011). Development of genomic resources for the narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius*): construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library and BAC-end sequencing. *BMC Genomics* 12, 521.
- Gladstones J.S. (1998). Distribution, origin, taxonomy, history and importance. In: *Lupinus as crop plants: biology, production, and utilization*, eds. J.S. Gladstones, C.A. Atkins & J. Hamblin. CAB International, 1-36.
- Hajdera I. i in. (2003). Molecular cytogenetic analysis of genome structure in *Lupinus angustifolius* and *Lupinus cosentinii*. *Theor Appl Genet* 107, 988-996.
- Hane J.K. i in. (2017). A comprehensive draft genome sequence for lupin (*Lupinus angustifolius*), an emerging health food: insights into plant–microbe interactions and legume evolution. *Plant Biotechnol J* 15, 318-330.
- Hasterok R. i in. (2006). Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of Brassicaceae. *Ann Bot* 97, 205-216.
- Hoen D.R. i in. (2015). A call for benchmarking transposable element annotation methods. *Mobile DNA* 6, 13.
- Houben A. i in. (2003). Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content. *Plant J* 33, 967-973.
- Idziak D. i in. (2011). Painting the chromosomes of *Brachypodium*: current status and future prospects. *Chromosoma* 120, 469-479.
- Iovene M. i in. (2008). Major cytogenetic landmarks and karyotype analysis in *Daucus carota* and other Apiaceae. *Am J Bot* 95, 793-804.
- Jackson S. Chen Z.J. (2010). Genomic and expression plasticity of polyploidy. *Curr Opin Plant Biol* 13, 153-159.
- Jang T.S. i in. (2013). Chromosomal diversification and karyotype evolution of diploids in the cytologically diverse genus *Prospero* (Hyacinthaceae). *BMC Evol Biol* 13, 136.
- Jordan W.T., Schmitz R.J. (2016). The shocking consequences of hybrid epigenomes. *Genome Biol* 17, 1-3.
- Kamphuis L.G. i in. (2015). Transcriptome sequencing of different narrow-leafed lupin tissue types provides a comprehensive uni-gene assembly and extensive gene-based molecular markers. *Plant Biotechnol J* 13, 14-25.
- Kasprzak A. i in. (2006). The bacterial artificial chromosome (BAC) library of the narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Cell Mol Biol Lett* 11, 396-407.
- Kim K.D. i in. (2015). A Comparative epigenomic analysis of polyploidy-derived genes in soybean and common bean. *Plant Physiol* 168(4), 1433–1447.
- Kolmogorov M. i in. (2018). Chromosome assembly of large and complex genomes using multiple references. *Genome Res* 28, 1720-1732.
- Kroc M. i in. (2014). New evidence of ancestral polyploidy in the Genistoid legume *Lupinus angustifolius* L. (narrow-leafed lupin). *Theor Appl Genet* 127, 1237-1249.
- Kulikova O. i in. (2001). Integration of the FISH pachytene and genetic maps of *Medicago truncatula*. *Plant J* 27, 49-58.
- Leal-Bertioli S.C.M. i in. (2015). *Arachis batizocoi*: a study of its relationship to cultivated peanut (*A. hypogaea*) and its potential for introgression of wild genes into the peanut crop using induced allotetraploids. *Ann Bot* 115, 237-249.
- Lesniewska K. i in. (2011). Assignment of 3 genetic linkage groups to 3 chromosomes of narrow-leafed lupin. *J Hered* 102, 228-236.
- Li Q. i in. (2014). Genetic perturbation of the maize methylome. *The Plant Cell* 26, 4602-4616.
- Lin J.Y. i in. (2010). Structural and functional divergence of a 1-Mb duplicated region in the soybean (*Glycine max*) genome and comparison to an orthologous region from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell* 22, 2545-2561.
- Lusinska J. i in. (2018). Chromosome identification and reconstruction of evolutionary rearrangements in *Brachypodium distachyon*, *B. stacei* and *B. hybridum*. *Ann Bot* 122, 445-459.
- Lysak M.A. i in. (2016). Comparative paleogenomics of crucifers: ancestral genomic blocks revisited. *Curr Opin Plant Biol* 30, 108-115.
- Mandáková T. i in. (2018). Hybridization-facilitated genome merger and repeated chromosome fusion after 8 million years. *Plant J* 96, 748-760.
- Mandáková T. i in. (2013). The more the merrier: recent hybridization and polyploidy in *Cardamine*. *The Plant Cell* 25, 3280-3295.
- Mur L.A.J. i in. (2011). Exploiting the *Brachypodium* tool box in cereal and grass research. *New Phytol* 191, 334-347.
- Murat F. i in. (2015). Karyotype and gene order evolution from reconstructed extinct ancestors highlight contrasts in genome plasticity of modern rosids crops. *Genome Biol Evol* 7, 735-749.

- Naganowska B., Zielinska A. (2002). Physical mapping of 18S-25S rDNA and 5S rDNA in *Lupinus* via fluorescent *in situ* hybridization. *Cell Mol Biol Lett* 7, 665-670.
- Naganowska B. i in. (2003). Nuclear DNA content variation and species relationships in the genus *Lupinus* (Fabaceae). *Ann Bot* 92, 349-355.
- Naganowska B. i in. (2006). 2C DNA variation and relationships among New World species of the genus *Lupinus* (Fabaceae). *Plant Syst Evol* 256, 147-157.
- Nelson M.N. i in. (2010). Aligning a new reference genetic map of *Lupinus angustifolius* with the genome sequence of the model legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res* 17, 73-83.
- Niederhuth C.E. i in. (2016). Widespread natural variation of DNA methylation within angiosperms. *Genome Biology* 17, 194.
- Pagel J. i in. (2004). Segmental duplications within the *Glycine max* genome revealed by fluorescence *in situ* hybridization of bacterial artificial chromosomes. *Genome* 47, 764-768.
- Renny-Byfield S., Wendel J.F. (2014). Doubling down on genomes: polyploidy and crop plants. *Am J Bot* 101, 1711-1725.
- Salse J., Feuillet C. (2011). Palaeogenomics in cereals: modeling of ancestors for modern species improvement. *C R Biol* 334, 205-211.
- Schmitz R.J. i in. (2011). Transgenerational epigenetic instability is a source of novel methylation variants. *Science* 334, 369.
- Schmitz R.J. i in. (2013). Epigenome-wide inheritance of cytosine methylation variants in a recombinant inbred population. *Genome Res* 23, 1663-1674.
- Schubert I. (2007). Chromosome evolution. *Curr Opin Plant Biol* 10, 109-115.
- Seymour D.K. i in. (2014). Evolution of DNA methylation patterns in the *Brassicaceae* is driven by differences in genome organization. *PLoS Genet* 10, e1004785.
- Shi J., Dawe R.K. (2006). Partitioning of the maize epigenome by the number of methyl groups on histone H3 lysines 9 and 27. *Genetics* 173, 1571-1583.
- Steele K.P. i in. (2010). Phylogeny and character evolution in *Medicago* (Leguminosae): Evidence from analyses of plastid *trnK/matK* and nuclear *GA3ox1* sequences. *Am J Bot* 97, 1142-1155.
- Talukdar D. (2012). Meiotic consequences of selfing in grass pea (*Lathyrus sativus* L.) autotetraploids in the advanced generations: Cytogenetics of chromosomal rearrangement and detection of aneuploids. *The Nucleus* 55, 73-82.
- Vasconcelos E.V. i in. (2015). Intra- and interchromosomal rearrangements between cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) revealed by BAC-FISH. *Chromosome Res* 23, 253-266.
- Visendi P. i in. (2016). An efficient approach to BAC based assembly of complex genomes. *Plant methods* 12, 2-2.
- Wendel J.F. i in. (2016). Evolution of plant genome architecture. *Genome Biol* 17, 1-14.
- Wicker T., Keller, B. (2007). Genome-wide comparative analysis of copia retrotransposons in Triticeae, rice, and *Arabidopsis* reveals conserved ancient evolutionary lineages and distinct dynamics of individual copia families. *Genome Res* 17, 1072-1081.
- Wolny E. i in. (2011). Compact genomes and complex evolution in the genus *Brachypodium*. *Chromosoma* 120, 199-212.
- Wyrwa K. i in. (2016). Integration of *Lupinus angustifolius* L. (narrow-leaved lupin) genome maps and comparative mapping within legumes. *Chromosome Res* 24, 355-378.
- Xiong Z., Pires J.C. (2011). Karyotype and identification of all homoeologous chromosomes of allopolyploid *Brassica napus* and its diploid progenitors. *Genetics* 187, 37-49.
- Zhang L. i in. (2016). Identification of peanut (*Arachis hypogaea*) chromosomes using a fluorescence *in situ* hybridization system reveals multiple hybridization events during tetraploid peanut formation. *New Phytol* 211, 1424-1439.
- Zhu H. i in. (2005). Bridging model and crop legumes through comparative genomics. *Plant Physiol* 137, 1189-1196.
- Zilberman D., Henikoff S. (2004). Silencing of transposons in plant genomes: kick them when they're down. *Genome Biol* 5, 1-5.

Handwritten signature
23.04.2018