

DR ANETTA KUCZYŃSKA
ZESPÓŁ FENOTYPOWANIA I GENOTYPOWANIA ZBÓŻ
ZAKŁAD BIOTECHNOLOGII
INSTYTUT GENETYKI ROŚLIN
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
UL. STRZESZYŃSKA 34, 60-479 POZNAŃ

AUTOREFERAT

**Zmienność na poziomie fenotypowym i molekularnym w populacjach linii
homozygotycznych jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) w powiązaniu z
efektami genu półkarłowatości *sdw1/denso***



POZNAŃ 2014

Załącznik nr 2

AUTOREFERAT

1. Anetta Kuczyńska**Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk (IGR PAN) w Poznaniu**

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

- Doktor nauk rolniczych, dyscyplina – agronomia (13.02.2005 r.); Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Praca doktorska pt.: „Zależność między zróżnicowaniem genetycznym form rodzicielskich a częstością efektów transgresji u jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.)”, wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Surmy.
- Magister biologii (18.06.1999 r.); Wydział Biologii, specjalność biologia molekularna, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Praca magisterska pt.: „Izolacja ludzkiego genu tRNA^{Leu} zawierającego intron”, wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Szwejkowskiej-Kulińskiej w Zakładzie Ekspresji Genów Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

- 2005- obecnie – adiunkt, Pracownia Genetyki Ilościowej przekształcona 1.01.2013 r. w Zakład Biotechnologii, Zespół Fenotypowania i Genotypowania Zbóż, Instytut Genetyki Roślin PAN.
- 1999-2005 – doktorantka, Pracownia Genetyki Ilościowej, Instytut Genetyki Roślin PAN.

4. Wskazanie osiągnięcia* 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. Nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Cykl sześciu publikacji pod wspólnym tytułem:

Zmienność na poziomie fenotypowym i molekularnym w populacjach linii homozygotycznych jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) w powiązaniu z efektami genu półkarłowatości *sdw1/denso*

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

(podano IF z roku opublikowania pracy; w przypadku prac opublikowanych w roku 2014 podano dostępny IF z roku 2013; punkty MNiSW podano według uaktualnionej w 2012 r. listy)

1. **Kuczyńska A.**, Mikołajczak K., Ćwiek H. (2014). Pleiotropic effects of the *sdw1* locus in barley populations representing different rounds of recombination. *Electron. J. Biotechnol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.07.005>. [IF₂₀₁₃ = **0,647**; MNiSW = 20 pkt]
2. **Kuczyńska A.**, Surma M., Adamski T., Mikołajczak K., Krystkowiak K., Ogrodowicz P. (2013). Effects of the semi-dwarfing *sdw1/denso* gene in barley. *J. Appl. Genet.* 54(4):381-390. [IF₂₀₁₃ = **1,902**; MNiSW = 20 pkt]
3. **Kuczyńska A.**, Kosmala A., Surma M., Adamski T. (2012). Identification of tillering node proteins differentially accumulated in barley recombinant inbred lines with different juvenile growth habits. *Int. J. Mol. Sci.* 13:10410-10423. [IF₂₀₁₂ = **2,464**; MNiSW = 30 pkt]
4. **Kuczynska A.**, Wyka T. (2011). The effect of the *denso* dwarfing gene on morpho-anatomical characters in barley recombinant inbred lines. *Breeding Sci.* 61:275-280. [IF₂₀₁₁ = **1,248**; MNiSW = 30 pkt]
5. **Kuczyńska A.**, Surma M., Kaczmarek Z., Adamski T. (2007). Relationship between phenotypic and genetic diversity of parental genotypes and the frequency of transgression effects in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breeding* 126:361-368. [IF₂₀₀₇ = **1,092**; MNiSW = 25 pkt]

6. **Kuczyńska A.**, Surma M., Adamski T. (2007). Methods to predict transgressive segregation in barley and other self pollinated crops. *J. Appl. Genet.* 48(4):321-328. [IF₂₀₀₇ = **0,967**; MNiSW = 20 pkt].

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

I. Wprowadzenie

Badania dotyczące podstaw zmienności fenotypu jęczmienia leżą w kręgu zainteresowań zarówno hodowców jak i genetyków. Z punktu widzenia hodowców ważne jest uzyskanie informacji na temat wartości danej kombinacji par rodzicielskich pod kątem uzyskania lepszego potomstwa niż formy wyjściowe, natomiast z punktu widzenia genetyków interesujące jest poznanie genetycznego uwarunkowania obserwowanej zmienności fenotypowej.

Do lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku informacje o genetycznych uwarunkowaniach cech użytkowych, które w większości należą do cech ilościowych, uzyskiwano głównie na podstawie obserwacji fenotypowych mieszańców różnych pokoleń lub populacji linii homozygotycznych, do opracowania których stosowano odpowiednie metody statystyczne (Mather i Jinks 1982). Populacje linii homozygotycznych analizowano, między innymi, w aspekcie częstości występowania form o polepszonych w stosunku do odmian rodzicielskich wartościach cech, co legło u podstaw poszukiwań efektywnych metod przyspieszających postęp w hodowli roślin. W populacjach linii homozygotycznych wszystkie linie, które trwale wykraczają poza zakres zmienności form rodzicielskich, określane są jako linie transgresyjne (Barbacki i in. 1978). Zjawisko przewyższania przez mieszańce form wyjściowych obserwowane może być również we wczesnych pokoleniach (F_2 , F_3), ale w tych przypadkach „lepsze” rośliny mieszańcowe mogą być heterozygotyczne, a ich przewaga nad genotypami rodzicielskimi może nie utrzymywać się w następnych pokoleniach. Dlatego też techniki pozwalające z heterozygotycznych mieszańców otrzymać w stosunkowo krótkim czasie linie homozygotyczne, jak na przykład haploidyżacja i uzyskiwanie linii podwojonych haploidów (DH) czy metoda pojedynczego ziarna (SSD), znalazły zastosowanie zarówno w badaniach genetycznych jak i w pracach hodowlanych. Populacje linii homozygotycznych, otrzymane bez stosowania selekcji, stanowią bardzo dogodny materiał do analizowania częstości występowania korzystnych rekombinantów, jak

również w analizie genetycznej cech ilościowych (Bjørnstad i in. 1993, Poulsen i in. 1995, Thomas i in. 1995, Surma i in. 1998, Kuczyńska i in. 2007).

Począwszy od lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku wraz z rozwojem metod molekularnych datuje się zastosowanie markerów molekularnych do tworzenia map genetycznych, najczęściej populacji linii homozygotycznych, oraz poszukiwania miejsc w genomach roślinnych, w których mogą występować geny odpowiedzialne za zmienność obserwowanych cech ilościowych. Od kilkunastu lat badania dotyczące molekularnych podstaw zmienności cech ilościowych obejmują analizę cech fenotypowych w odniesieniu do fragmentów sekwencji genomowych poznanych eksperymentalnie i zlokalizowanych na mapach genomów (Jansen i Nap 2001). Celem tych badań jest rozwój systemów markerów molekularnych, które pozwoliłyby identyfikować obecność w roślinach alleli genów determinujących interesujące cechy ilościowe. Właśnie takie badania stały się podstawą poszukiwań markerów funkcjonalnych (FM), które odnoszą się do rejonu genomu (genów) scharakteryzowanego pod względem sekwencji i funkcji. Termin „markery funkcjonalne” został zaproponowany i jednoznacznie zdefiniowany przez Andersena i Lübberstedta w 2003 roku dla markerów DNA opracowanych na podstawie sekwencji motywów polimorficznych genów odpowiedzialnych za obserwowaną zmienność fenotypową cechy (Andersen i Lübberstedt 2003). Do opracowania markerów FM niezbędne jest funkcjonalne scharakteryzowanie wybranych genów i znajomość sekwencji ich alleli, a następnie identyfikacja polimorficznych motywów funkcjonalnych w obrębie tych genów, wpływających na obserwowane cechy fenotypowe, i potwierdzenie związku między polimorfizmem DNA a zmiennością cech. Oprócz określenia funkcji i sekwencji genów istotnym elementem w opracowywaniu markerów FM są badania asocjacyjne. Badania te powinny obejmować dużą liczbę osobników/linii o różnym podłożu genetycznym, bardzo dokładnie opisanych pod względem interesujących cech ilościowych i zanalizowanych pod względem molekularnym, aby można było różnym wariantom allelicznym genu przypisać określone wartości obserwowanej cechy. Dopiero potwierdzenie na szerokim tle genetycznym związku między polimorfizmem sekwencji motywów funkcjonalnych a zmiennością cechy uprawnia do stwierdzenia, że opracowany marker jest markerem funkcjonalnym dla danej cechy ilościowej, który może być stosowany w każdej populacji danego gatunku. W przypadku zbóż jest niewiele genów, dla których możliwe jest opracowanie markerów funkcjonalnych. Podaje się, że u jęczmienia takim genem może być gen półkarłowatości *sdw1/denso* (Peng i in. 1999). Każde badania przybliżające do opracowania markerów

funkcjonalnych dla genów determinujących cechy o znaczeniu agronomicznym mają duże znaczenie, szczególnie w hodowli nowych odmian.

II. Cel

Podstawowym celem badań w prezentowanych pracach było:

(1) charakterystyka podstaw zmienności fenotypu jęczmienia związanej z częstością otrzymywania transgresyjnych segregantów w populacjach linii homozygotycznych uzyskanych różnymi technikami,

(2) analiza efektów fenotypowych locus *sdw1/denso* na podstawie analiz morfo-anatomicznych, proteomicznych, molekularnych i biometrycznych,

(3) odróżnienie efektu plejotropowego genu półkarłowatości od występowania w tym samym rejonie genomu genów ściśle ze sobą sprzężonych.

III. Materiał i metody badań

Materiał roślinny do badań stanowiły odmiany, linie hodowlane i linie homozygotyczne jęczmienia znacznie zróżnicowane pod względem szeregu cech, m.in. różniące się rzędowością kłosa, oplewieniem ziarna czy typem użytkowania. W badaniach efektów fenotypowych locus *sdw1/denso* posłużono się populacjami linii homozygotycznych z kombinacji krzyżówkowej Maresi × Pomo. Odmiana Maresi wnosi gen półkarłowatości *sdw1.d* od znajdującej się w jej rodowodzie odmiany Diamant – półkarłowatego mutantu uzyskanego poprzez traktowanie odmiany Valticky promieniami X (Bouma 1967). Odmiany te ponadto różnią się pod względem rzędowości kłosa: Maresi jest browarną odmianą dwurzędową o luźnym, zwisłym kłosie, natomiast Pomo jest pastewną formą o kłosie sześciorzędowym i zbitym. Linie w uzyskanych populacjach segregują pod względem genu półkarłowatości, jak również wykazują dużą zmienność cech struktury plonu.

Najważniejsze metody wykorzystywane w badaniach:

- uzyskanie populacji linii homozygotycznych poprzez haploidyzację mieszańców metodą wykorzystującą zjawisko eliminacji chromosomów w krzyżowaniach jęczmienia uprawnego z *Hordeum bulbosum* oraz techniką pojedynczego ziarna,
- fenotypowanie roślin w warunkach szklarniowych i polowych pod względem typu wzrostu, stadiów rozwojowych, cech morfologicznych oraz cech plonotwórczych,
- charakterystyka morfo-anatomiczna nadziemnych organów roślin jęczmienia wraz z pomiarami wykonywanymi na obrazach z mikroskopu świetlnego,

- analiza poziomu akumulacji białek w populacjach linii różniących się typem młodocianego wzrostu przy wykorzystaniu 2-D elektroforezy i spektrometrii mas,
- genotypowanie analizowanych form jęczmienia przy wykorzystaniu różnych systemów markerowych oraz różnych technik rozdziału uzyskanych produktów PCR,
- identyfikacja *loci* warunkujących cechy ilościowe (QTL) lokalizujących się w rejonie w locus *sdw1/denso* w chromosomie 3H w powiązaniu z różnym typem młodocianego wzrostu w populacjach linii homozygotycznych reprezentujących zmienność rekombinacyjną wynikającą z różnej liczby *crossing-over*.

IV. Analiza częstości występowania transgresyjnych segregantów

Wynikiem działania człowieka i selekcji pod wpływem czynników środowiska było powstanie odmian w dużym stopniu różniących się od form wyjściowych. Z kolei zawężenie zmienności genetycznej w wyniku hodowli powoduje, że różnice międzyodmianowe są niewielkie. Z tego powodu określenie genetycznego zróżnicowania pomiędzy odmianami tylko na podstawie cech fenotypowych jest trudne. Zawężona pula genowa z jednej strony i znaczący wpływ środowiska na kształtowanie się wartości fenotypowych większości cech plonotwórczych z drugiej sprawia, że wybór do krzyżowań komponentów o dużym potencjale genetycznym jest trudny. Poszukiwanie metod ułatwiających dobór takich form, których potomstwo byłoby bardziej wartościowe od rodziców, znalazło się u podstaw wielu klasycznych analiz genetyczno-statystycznych dotyczących dziedziczenia cech ilościowych (Kuczyńska i in., *J. Appl. Genet.* 2007).

Częstość występowania linii transgresyjnych w odniesieniu do tej samej cechy ilościowej jest różna w różnych kombinacjach krzyżówkowych (Surma 1996). Z hodowlanego punktu widzenia istotną byłaby więc uzyskana *á priori* informacja o potencjalnej zdolności danej pary form rodzicielskich do wydania transgresyjnego potomstwa. Wraz z rozwojem metod biometrycznych uważano, że informacje o ogólnej zdolności kombinacyjnej (GCA) form wyjściowych, która jest oceniana na podstawie analizy mieszańców F₁ lub F₂, mogą być podstawą doboru par rodzicielskich. Stwierdzono, że przy pewnych założeniach ogólna zdolność kombinacyjna związana jest z efektami addytywnego działania genów, które są utrwalane w procesie hodowli (Griffing 1956, Dobek i in. 1978). Jinks i Pooni (1976 r.) wykazali, że prawdopodobieństwo pojawienia się transgresyjnych segregantów w losowej próbie wszystkich możliwych linii homozygotycznych wyprowadzonych z kombinacji krzyżówkowej pomiędzy dwiema homozygotycznymi formami rodzicielskimi można oszacować na podstawie ilorazu efektów addytywnych [d] i

pierwiastka kwadratowego z wariancji addytywnej, D – im mniejsza wartość tego ilorazu, tym prawdopodobieństwo wystąpienia transgresyjnych segregantów jest większe. Wynika stąd, że przy doborze par rodzicielskich ważne jest, aby niewielkiej różnicy między nimi w wartościach danej cechy (estymatorem parametru $[d]$ jest połowa różnicy między formami rodzicielskimi) towarzyszyła duża zmienność genetyczna (D). Taka sytuacja ma miejsce, gdy geny warunkujące daną cechę są mniej lub bardziej równomiernie rozłożone w genomach form rodzicielskich (tzn. gdy występuje dyspersja genów). Metoda zaproponowana przez Jinksa i Pooni'ego nie znalazła szerszego zastosowania w praktycznej hodowli – uzyskanie oceny parametru $[d]$ jest bowiem proste, jednakże uzyskanie oceny wariancji addytywnej wymaga przeprowadzenia dodatkowych doświadczeń, poza programem hodowlanym, związanych z koniecznością jednoczesnej analizy mieszańców F_2 oraz mieszańców z krzyżowań wstecznych (Mather i Jinks 1982), bądź analizy populacji linii homozygotycznych (Snape i Simpson 1981). Jednakże idea przedstawiona w tej metodzie dała podstawy do poszukiwania innych sposobów oceny zmienności genetycznej par rodzicielskich, w tym poprzez oszacowanie odległości genetycznej na podstawie markerów molekularnych.

Od połowy lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku zaczęto prowadzić prace, w których badany był związek między odległością genetyczną par rodzicielskich a wartością ich homozygotycznego potomstwa. W pracy **Kuczyńska i in. (Plant Breed. 2007)** wykazano u jęczmienia występowanie zależności między zróżnicowaniem genetycznym form rodzicielskich a częstością efektów transgresji w populacjach linii DH w odniesieniu do niektórych cech agronomicznych. Przedstawiono wyniki analizy molekularnej form wyjściowych kilkunastu kombinacji krzyżówkowych jęczmienia oraz wyniki fenotypowania mieszańców pokolenia F_2 i populacji linii homozygotycznych tych kombinacji. Formami wyjściowymi były odmiany, linie hodowlane i linie podwojonych haploidów zróżnicowane pod względem fenotypowym – różniły się rzędowością kłosa, oplewieniem ziarna, a także typem użytkowania. Zastosowanie wielozmiennej analizy statystycznej pozwoliło ocenić różnice fenotypowe między parami form rodzicielskich pod względem wszystkich analizowanych cech łącznie (tzw. odległość Mahalanobisa), a więc wyodrębnić pary najmniej fenotypowo różniące się. Przy zastosowaniu tego podejścia można było także znaleźć odmiany wyraźnie odrębne, jak np. Maresi, niosąca gen półkarłowatości *sdw1.d*. Stwierdzone zróżnicowanie form rodzicielskich pod względem fenotypowym było w dużym stopniu zgodne z danymi o pochodzeniu analizowanych form jęczmienia. W badanych populacjach linii DH wytworzonych z mieszańców F_1 analizowano częstość transgresji. Stwierdzono przewagę częstości występowania efektów transgresji ujemnej pod względem wszystkich

analizowanych cech, nad częstością efektów transgresji dodatniej. Najwięcej przypadków transgresji dodatniej obserwowano w odniesieniu do masy tysiąca ziaren, najmniej – do plonu ziarna. Z kolei najwięcej przypadków transgresji ujemnej obserwowano w odniesieniu do długości kłosa, najmniej – do zawartości białka. Wyniki te tłumaczą trudności w wyhodowaniu plennych odmian jęczmienia browarnego o odpowiednio niskiej zawartości białka. Brak pełnej zgodności między obserwowaną a przewidywaną częstością efektów transgresji może wynikać z faktu niespełnienia warunków o niewystępowaniu nieallelicznej interakcji bądź braku sprzężeń między genami kontrolującymi daną cechę ilościową, które są konieczne do wiarygodnego oszacowania wariacji addytywnej w danej populacji. Dodatkowo różnice między obserwowaną częstością linii transgresyjnych w odniesieniu do plonu ziarna z poletka a przewidywaną na podstawie masy ziarna z rośliny F_2 sugerują, iż selekcja roślin F_2 ze względu na plon ziarna z rośliny może być mało efektywna. Wykazano istnienie związku między liczbą linii transgresyjnych, analizowanych pod kątem danej cechy, a współczynnikiem rozkładu genów kontrolujących tę cechę u form wyjściowych: liczba efektów transgresji, zarówno dodatniej jak i ujemnej, jest tym większa, im większy jest stopień dyspersji genów u form rodzicielskich. Stwierdzono, że odległość genetyczna, oszacowana na podstawie markerów molekularnych, może być wykorzystana do wyboru par rodzicielskich dających największe szanse na uzyskanie transgresyjnego potomstwa, jednakże łącznie z informacją o efektach addytywnego działania genów. Takie markery mogą być wykorzystane w hodowli, jednakże należy wziąć pod uwagę, że w różnych populacjach tego samego gatunku mogą segregować różne allele. Ponadto badania prowadzone z zastosowaniem różnych systemów markerowych mogą lokalizować QTL w innych rejonach genomu, liczba i lokalizacja wykrytych QTL może być różna w różnych warunkach środowiska a sprzężenia marker-cecha mogą być przerwane w wyniku rekombinacji (Tinker i in. 1996). Dodatkowo w tym samym regionie genomu mogą być zlokalizowane QTL dla różnych cech ilościowych (Hayes i in. 1993). Niedoskonałości markerów tego typu można przezwyciężyć poprzez rozwój systemów markerów molekularnych, które pozwoliłyby identyfikować obecność w roślinach alleli genów (jak np. *sdw1.d*) determinujących interesujące cechy ilościowe, czyli markerów funkcjonalnych. Jednocześnie stwierdzono na podstawie uzyskanych wyników, że populacja otrzymana z kombinacji krzyżówkowej Maresi × Pomo stanowi cenny materiał badawczy nad efektami genu półkarłowatości u jęczmienia.

V. Typowanie *sdw1/denso* celem opracowania markera FM dla wysokości roślin

Badania nad lokalizacją chromosomową loci dla cech ilościowych wykazały istnienie w genomie jęczmienia rejonów odpowiedzialnych za kilka cech ilościowych jednocześnie. Jednym z nich jest obszar wokół locus *denso* na długim ramieniu chromosomu 3(3H). Stwierdzono istnienie zależności między występowaniem genu półkarłowatości *denso* (= *sdw1*) a typem wzrostu w stadium młodocianym, wysokością roślin, opóźnionym kłoszeniem i dojrzewaniem oraz obniżoną masą 1000 ziaren, przy czym nie stwierdzono jednoznacznie, czy jest to efekt plejotropowy locus *denso*, czy też sprzężenie tego locus z innymi genami warunkującymi cechy ilościowe (Kuczyńska i in. 2013).

Wyróżnia się cztery typy jęczmienia o zredukowanej wysokości roślin: *brachytic*, *erectoid*, *uzu*, *sdw1/denso* (Mickelson i Rasmusson 1994). *Brachytic* i *erectoid* nie znajdują zastosowania w programach hodowlanych ze względu na gorszą jakość ziarniaków (zredukowana wielkość i niska wartość pod względem ekstraktu słodowego). Zwarte, zbite kłosy typu *erectoid* zwiększają podatność na choroby w warunkach dużej wilgotności, a egzogenna giberelina nie przełamuje karłowatości roślin (Jia i in. 2009). Typ *uzu*, występujący w krajach azjatyckich, związany jest z niewrażliwością na brassinosteroidy (Chono i in. 2003, Saisho i in. 2004).

Z kolei w przypadku *sdw1* znane są jego cztery allele. Jeden z nich o nazwie *denso* wykryto w spontanicznym mutancie uzyskanym z odmiany Abed Denso w Danii (Haahr i von Wettstein 1976). Pozostałe trzy allele zostały znalezione w mutantach indukowanych mutagenami fizycznymi. Allel pochodzący od odmiany Valticky, zarejestrowany w Czechosłowacji w 1965 roku jako odmiana Diamant, został wprowadzony do około 150 nowych odmian europejskich (Bouma 1967, Grausgruber i in. 2002) Inny allel *sdw1*, wywołany promieniami rentgenowskimi w norweskiej sześciorzędowej odmianie Jotun, znany jest jako linia nr 66/86 (Rasmussen i in. 1973). Kolejny odkryty w pokoleniu M2 odmiany Bomi nazwano Risø nr 9265 i został uznany za bardzo obiecujący w hodowli odmian półkarłowatych (Haahr i von Wettstein 1976). Mimo, że *sdw1* i *denso* pojawiły się w wyniku odrębnych mutacji okazało się, że są alleliczne względem siebie i wywierają podobny wpływ na cechy agronomiczne (Barua i in. 1993, Laurie i in. 1993, Hellewell i in. 2000). Odmiany posiadające gen półkarłowatości wykazują zwiększoną odporność na wyleganie, które powoduje obniżenie nie tylko plonu, ale również jakości ziarna, przez co uzyskuje się uboższy ekstrakt słodowy (Dahleen i in. 2005). Głównym efektem fenotypowym locus *sdw1/denso* jest zmniejszenie wysokości roślin o około 10-20 cm w zależności od warunków środowiska (np. Hellewell i in. 2000). Morfologicznym markerem *sdw1/denso* jest typ

wzrostu roślin w stadium młodocianym, mianowicie rośliny posiadające gen *sdw1* charakteryzują się płozącym, podczas gdy rośliny z jego allelem dominującym odznaczają się wzniosłym typem wzrostu (Haahr i von Wettstein 1976).

Zespół Jia i in. (2009) przeprowadził analizę porównawczą genu *denso* z genem półkarłowatości *sd1* (*Os20ox2*) u ryżu, kodującym oksydazę kwasu giberelinowego (GA)-20. Autorzy ci wyszli z założenia, że w wyniku syntenii jęczmień-ryż gen *sdw1/denso* jęczmienia powinien mieć podobną strukturę jak *sd1* ryżu. Materiałem badawczym była populacja linii DH Baudin × AC Metcalfe (Baudin — półkarłowa odmiana z genem *denso*). Używając starterów opartych o konserwatywne rejony genu *Os20ox2* ryżu wyizolowano z genomu jęczmienia fragment genu *Hv20ox2* o długości 2 413 pz, kodującego oksydazę 20 biorącą udział w biosyntezie kwasu giberelinowego. Stwierdzono, że *Hv20ox2* jęczmienia ma podobną strukturę do genu *Os20ox2* (trzy egzony i dwa introny). Opierając się na wynikach prac nad ryżem autorzy przewidują, że gen *Hv20ox2*, będący ortologiem genu *sd1* u ryżu, może kontrolować etap biosyntezy giberelin od GA53 do GA44. Autorzy wykazali, że *denso* jest allelem genu *Hv20ox2*, który w populacji Baudin × AC Metcalfe kolokalizował z wysokością roślin. Stwierdzono również, że różnica między odmianą półkarłową Baudin a Metcalfe w sekwencji wyizolowanego fragmentu genu dotyczy substytucji pojedynczego nukleotydu.

Można zatem stwierdzić, że w przypadku genu *denso* u jęczmienia poznana jest jego struktura i funkcja (choć badania te nie są jeszcze zakończone) oraz znany jest jego związek ze zmiennością cech ilościowych. Wobec tego uzasadnione jest, aby gen ten kandydował do opracowania markera FM dla wysokości roślin, a przypuszczalnie także dla innych cech ilościowych u jęczmienia. Wynika to z faktu, że gen ten - podobnie jak gen *Dwarf8* u kukurydzy (Thornsberry i in. 2001) - wykazuje efekty plejotropowe w odniesieniu do kilku innych cech ilościowych związanych z plonowaniem, jak dotąd stwierdzone jednak tylko na poziomie fenotypowym.

VI. Efekty genu *sdw1/denso* w odniesieniu do cech morfo-anatomicznych

Zbadano efekty genu półkarłowatości *sdw1/denso* na wybrane cechy morfologiczne nadziemnych organów roślin jęczmienia w fazie krzewienia i kłoszenia oraz cechy anatomiczne blaszek liściowych w liniach o normalnym i zredukowanym typie wzrostu uzyskanych z kombinacji krzyżówkowej Maresi × Pomo w fazie krzewienia (**Kuczyńska i Wyka 2011**). Rośliny zawierające gen półkarłowatości miały podobny stopień rozkrzewienia jak rośliny o normalnym typie wzrostu. Natomiast ich blaszki liściowe były krótsze średnio o

ok. 10-20% od blaszek roślin kontrolnych. W fazie krzewienia krótsze też były pochwy liściowe, zaś w fazie kłoszenia mniejsze były szerokości blaszek.

W doniesieniach literaturowych dotyczących zbóż opisano szereg genów wpływających na obniżenie wysokości, jednak tylko w nielicznych przypadkach podjęto próby korelacji fenotypów makroskopowych ze zmianami anatomicznymi. W przypadku pszenicy efekty genów półkarłowatości na cechy morfo-anatomiczne zostały wyjaśnione zmniejszonymi rozmiarami komórek epidermalnych (Miralles i in. 1998), podczas gdy u jęczmienia nie znaleziono takich zależności (Wenzel i in. 1997). Podjęte przez nas badania miały na celu ustalenie, czy i jakie zmiany anatomiczne leżą u podłoża makroskopowych efektów działania genu *sdw1/denso*. Analizy anatomiczne obu grup genotypów prowadzono na liściach zebranych w fazie krzewienia, fotografując w mikroskopie świetlnym preparaty z epidermy doosiowej oraz trwałe przekroje przez środkowy rejon blaszki.

Epiderma liści jęczmienia, podobnie jak wielu innych gatunków roślin z rodziny Poaceae, zbudowana jest z kilku odrębnych rodzajów komórek, przy czym charakteryzuje się ona bardzo regularną topografią z komórkami ułożonymi w wyraźne szeregi, co ułatwia szczegółową analizę porównawczą na poziomie anatomicznym (Wenzel i in. 1997). W obrazach mikroskopowych liści roślin półkarłowatych obserwowano mniejsze rozmiary niektórych kategorii komórek epidermy liścia, zwłaszcza niezróżnicowanych komórek epidermalnych położonych w tzw. centralnych szeregach komórkowych (nie zawierających szparek), co było zgodne z efektem makroskopowym i wskazywało na efekt zmniejszający na poziomie komórkowym. Epiderma jest bowiem tkanką ograniczającą i regulującą wzrost blaszki liściowej. Obecność genu nie wpływała natomiast istotnie na długości komórek epidermalnych w szeregach przylegających do szeregów szparkowych ani na długości samych komórek szparkowych, choć istotnie zmniejszała zagęszczenie szparek. Efekt na poziomie komórkowym był tu więc niespójny z makroskopowym zahamowaniem wzrostu blaszki liściowej i sugerował raczej kompensacyjne zahamowanie tempa podziałów komórkowych w szeregach szparkowych przy braku zahamowania wzrostu komórek oddzielających od siebie kolejne szparki w rzędzie. Z kolei zwiększone zagęszczenie wiązek przewodzących (które u jęczmienia przebiegają wzdłuż blaszki liściowej i są łatwo rozpoznawalne w epidermie) u roślin z genem półkarłowatości oraz mniejsza liczba szeregów komórek epidermalnych pomiędzy wiązkami mogą być interpretowane jako efekt zmniejszania działający poprzez mniejszą częstotliwość podziałów komórkowych i/lub zahamowany wzrost komórek epidermalnych na szerokość. Efekt ten zachodził przy jednocześnie niezmienionej szerokości blaszki liści roślin półkarłowatych w tej fazie

rozwojowej, co sugeruje zwiększoną liczbę wiązek przewodzących w liściach roślin o rozłożystym typie wzrostu. Jednocześnie zmniejszający był natomiast efekt genu na rozmiary wiązek przewodzących obserwowanych na przekrojach poprzecznych przez blaszkę. Zmniejszeniu ulegały też średnice naczyń metaksylemu. Badania liści roślin półkarłowatych ujawniły zatem nie tylko przejawy zmniejszania na poziomie komórkowym i tkankowym, lecz wykazały także możliwości kompensacyjne, które mogą stabilizować lub modyfikować cechy wyższego rzędu. Zmniejszenie rozmiaru liści może być bowiem spowodowane zarówno zmniejszeniem wielkości komórek, jak również mniejszą liczbą podziałów komórkowych, a mechanizmy te są stosunkowo niezależne i potencjalnie mogą być regulowane we wzajemnie odwrotnych kierunkach.

Na uwagę zasługuje fakt, że gen *sdw1/denso* wpływał na cechy o bezpośrednim przełożeniu na funkcje fizjologiczne roślin. Rośliny z genem półkarłowatości, scharakteryzowane rozłożystym typem młodocianego wzrostu, okazały się mieć zmniejszone SLA (ang. *specific leaf area*) tzn. ich liście charakteryzowała większa biomasa na jednostkę powierzchni (Yin i in. 1999). Jest to ważna cecha wpływająca np. na wykorzystanie światła, produktywność fotosyntetyczną i zdolność konkurencyjną roślin. Mniejsza grubość liści roślin z genem półkarłowatości nie wskazuje jednak na mniejsze wartości SLA. Z drugiej strony większe zagęszczenie wiązek przewodzących, w skład których wchodzi komórki o grubych, częściowo zdrewniałych ścianach komórkowych, może przyczynić się do zwiększenia SLA. Drugą cechą o wyraźnym znaczeniu funkcjonalnym jest mniejsza szerokość naczyń ksylemu. Jest ona spójna ze zmniejszoną długością, a więc i powierzchnią transpiracyjną blaszek liściowych. Nie jest jednak jasne, czy zmniejszone przekroje naczyń to bezpośredni efekt działania genu *sdw1/denso* czy raczej efekt dostosowania wydajności ksylemu do wielkości liścia.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań ukazują kompleksowe zmiany fenotypowe sugerujące plejotropowe oddziaływanie genu *sdw1/denso* na poziomie zarówno organów, jak i tkanek oraz komórek.

VII. Identyfikacja poziomu akumulacji białek w zależności od efektu fenotypowego locus *sdw1/denso*

W kolejnym etapie podjęto także badania poziomu akumulacji białek w dwóch subpopulacjach linii różniących się efektem fenotypowym locus *sdw1/denso* w stadium młodocianym (Kuczyńska i in. 2012). U linii zróżnicowanych pod względem typu wzrostu rośliny w stadium młodocianym oraz w dwóch fazach rozwojowych: w stadium siewki – faza

13 w odniesieniu do skali BBCH, oraz w stadium krzewienia – faza 23 w odniesieniu do skali BBCH, wykonano analizy 2-D elektroforezy celem uzyskania profili akumulacji białek w różnych punktach czasowych. Białka o statystycznie istotnych różnicach w poziomie akumulacji między badanymi liniami identyfikowano przy wykorzystaniu spektrometrii mas. Zauważono, że formy różniące się pokrojem miały różne obrazy swoich białek wykazując różnice ilościowe. Dotyczyło to białek szoku termicznego, dużej podjednostki *RuBisCo* alfa i beta (*RuBisCo* jest białkiem, które stanowi ok. 50% wszystkich rozpuszczalnych białek występujących w liściach roślin), białka kodowanego przez gen *Os06g0114000*, chaperonin 60 kDa (białek opiekuńczych), białka wiążącego RNA chloroplastów, kodowanego przez gen *Cp31BHv*, a także przez gen *ES2A* o giberelino-zależnej ekspresji.

W ostatnich latach uzyskano znaczący postęp w poznaniu regulatorowych sieci genetycznych w roślinach modelowych, w szczególności związanych z aktywnością kwasu giberelinowego – jego syntezą oraz funkcjami na różnych etapach rozwoju rośliny. Jednakże szczegółowe mechanizmy regulacji ekspresji i działania giberelin u roślin użytkowych, w tym u jęczmienia, nie są w pełni poznane. W wyniku m.in. działania giberelin kształtuje się architektura dojrzałej rośliny, tj. długość pędu głównego oraz liczba i długość pędów bocznych. Różnice w architekturze roślin mogą być spowodowane m.in. obecnością genów półkarłowatości. U jęczmienia recesywny gen półkarłowatości *sdw1*, kodujący oksydazę GA-20, wpływa na zmianę pokroju roślin w stadium młodocianym: rośliny z genem półkarłowatości charakteryzują się rozłożystym pokrojem, w przeciwieństwie do roślin o niezredukowanej wysokości, które mają pokrój wzniosły (Bouma 1967, Hedden i Kamiya 1997, Jia i in. 2009). Polimorfizm genu kodującego oksydazę GA-20 skutkuje także różnicami pod względem innych, ważnych cech.

Sklasyfikowano ponad 100 rodzajów GA, z czego tylko nieliczne wykazują aktywność biologiczną, pozostałe są prekursorami lub produktami ich katabolizmu. Półkarłowatość, jako efekt fenotypowy locus *sdw1/denso*, związana jest z poziomem GA w komórkach. Kluczowymi enzymami w regulacji syntezy GA są oksydazy: GA20ox, GA3ox, GA2ox. GA20ox i GA3ox katalizują utlenianie odpowiednio 20 i 3 atomu węgla w cząsteczce GA aktywując ją. Natomiast GA2ox wpływa na inaktywację GA. Odkrycie receptorów dla GA, początkowo u ryżu, a następnie potwierdzone u *Arabidopsis*, pozwoliło na lepsze zrozumienie wpływu GA na wzrost i rozwój roślin (Chen i in. 2010). W szlaku sygnałowym giberelin istotną rolę odgrywają białka z nadrodziny GRAS posiadające 27-aminokwasowy motyw DELLA oraz białka GID1 i GID2. DELLA wiąże czynniki transkrypcyjne dla genów odpowiedzi na GA. Aktywna biologicznie giberelina przyłączana jest do jądrowego receptora

GID1, w którym zachodzą zmiany konformacyjne umożliwiające interakcje z domeną DELLA. Białko to również przechodzi zmiany konformacji i w efekcie do kompleksu GA-GID1-DELLA przyłącza się białko GID2, które odpowiada za ubikwitynację DELLA. Białko z ubikwityną kierowane jest do proteosomu, a proteolityczna degradacja DELLA powoduje uwolnienie czynników transkrypcyjnych genów odpowiedzi na GA, powodując ich ekspresję. Zatem redukcja wysokości roślin może wynikać z zaburzeń w trakcie biosyntezy GA, poprzez obniżenie ekspresji genów oksydazy giberelinowej 20 i 3 lub nadekspresję *GA2ox*. Zewnętrzne zaaplikowanie hormonu może uzupełnić braki GA powstałe w wyniku wadliwej biosyntezy w komórkach, przełamując w ten sposób półkarłowatość. Obniżona wysokość roślin może być również spowodowana nieprawidłowością w szlaku transdukcji sygnału giberelinowego, tj. dysfunkcją białek DELLA, GID1 lub GID2. Ten rodzaj karłowatości u roślin powoduje, że nie reagują na egzogenną GA. Hormon jest syntezowany i obecny w komórkach w odpowiedniej ilości, jednakże w wyniku zaburzeń nie następuje degradacja DELLA, zatem nie są uwalniane czynniki transkrypcyjne i w konsekwencji nie dochodzi do ekspresji genów odpowiedzi na GA.

Mechanizm półkarłowatości proponowany dla *denso* związany jest z obniżoną ekspresją genu oksydazy giberelinowej 20 – *HvGA20ox2*, a w rejonie locus *denso* zlokalizowano QTL wysokości, co jednoznacznie potwierdza wpływ tego genu na redukcję wzrostu rośliny. Poziom ekspresji *HvGA20ox2* w organach roślinnych jest zróżnicowany. Zdecydowanie niższą ekspresję stwierdza się w blaszce i pochwie liściowej oraz w łodydze, skutkuje to skróceniem liścia flagowego jak i dolnych międzywęźli. Jia i in. (2011) wykazali, że zmniejszona ekspresja *Hv20ox2* w roślinach z genem półkarłowatości skutkuje niższym poziomem GA w merystemie wierzchołkowym, co przyczynia się do zahamowania jego wzrostu i sprzyja rozwojowi pędów bocznych. Wzrost ekspresji genu kodującego ES2A odnotowano tylko w jęczmieniu o obniżonej wysokości (Speulman i Salamini 1995). W naszych badaniach zaobserwowano zwiększoną syntezę białek ES2A w liniach jęczmienia z genem półkarłowatości we wczesnych stadiach rozwojowych, czyli na etapie gdzie widoczny jest wyraźnie płożący typ wzrostu. W tych samych liniach jęczmienia w stadium krzewienia obserwowano zmniejszenie syntezy tych białek, a ich bardziej wzniosły pokrój może być częściowo spowodowany zmniejszoną ilością tego białka. Należy tutaj nadmienić, że badania te stanowią pierwsze w dostępnej literaturze analizy proteomiczne białek węzła krzewienia w różnych stadiach i typach młodocianego wzrostu u jęczmienia.

VIII. Odróżnienie efektu plejotropowego genu półkarłowatości od występowania w tym samym rejonie genomu genów ściśle ze sobą sprzężonych

W wielu dotychczasowych badaniach poruszających temat półkarłowatości u jęczmienia wykorzystywano jeden rodzaj populacji homozygotycznych (Barua i in. 1993, Yin i in. 1999, Li i in. 2006, Thomas i in. 2010). Jednak dla poznania efektów plejotropowych tego genu porównanie populacji jęczmienia reprezentujących zmienność rekombinacyjną wynikającą z różnej liczby *crossing-over* wydaje się być najbardziej uzasadnione (Kuczyńska i in. 2014). Odróżnienie efektu plejotropowego genu półkarłowatości w odniesieniu do cech ilościowych, w tym plonu i elementów jego struktury, od występowania w tym samym rejonie genomu genów ściśle ze sobą sprzężonych, które warunkują poszczególne cechy plonotwórcze nie jest łatwe, ponieważ nie ma metod pozwalających na podstawie tylko obserwacji fenotypowych rozróżnić te dwa zjawiska. Szansą może być połączenie podejścia biometrycznego z analizą molekularną populacji roślin segregujących w locus *sdw1/denso*. Celem podjętych przez nas badań było porównanie populacji linii podwojonych haploidów (DH) oraz populacji uzyskanej techniką pojedynczego ziarna (SSD) uzyskanych z kombinacji krzyżówkowej pomiędzy odmianami Maresi i Pomo. Zarówno system DH jak i SSD pozwalają uzyskać linie homozygotyczne w stosunkowo krótkim czasie, przy czym linie DH są homozygotyczne we wszystkich loci, natomiast linie SSD mogą zawierać tzw. resztkową heterozygotyczność. Przewaga techniki SSD nad DH wiąże się z większym prawdopodobieństwem wystąpienia rekombinantów, gdyż „wykorzystuje” kilka rund *crossing-over* (w przypadku linii SSD – 6 lub więcej w zależności od tego, do którego pokolenia była stosowana, natomiast linie DH otrzymanych z mieszańców $F_1 - 1$ runda), co zwiększa prawdopodobieństwo przerwania sprzężeń genów.

Gen *sdw1/denso* został zlokalizowany w długim ramieniu chromosomu 3H (Laurie i in. 1993). W tym samym regionie genomu jęczmienia zidentyfikowano oprócz wysokości roślin, także QTL dla kilku innych cech ilościowych, takich jak wczesność, plon ziarna, masa 1000 ziaren, specyficzna powierzchnia liścia oraz biomasy kłosa i liści (Thomas i in. 1991, Yin i in. 1999). W badaniach prezentowanej pracy wykorzystane zostały chromosomo-specyficzne markery molekularne SSR (ang. simple sequence repeat), dzięki czemu możliwe było wysycenie rejonu wokół locus *sdw1/denso* nowymi markerami. W obu analizowanych populacjach marker Bmag0013 był najbliższym sprzężonym z badanym locus. Identyfikacja i mapowanie *loci* warunkujących cechy ilościowe dokonywana była poprzez wykrywanie zależności pomiędzy obserwowaną zmiennością cechy z segregacją markerów molekularnych mapy genetycznej. Wykryte QTL lokalizowane były na mapie genetycznej w przedziale

mapowym ograniczonym markerami molekularnymi. W rejonie locus *sdw1/denso* zidentyfikowano QTL warunkujące wysokość roślin, datę kłoszenia oraz kwitnienia w obu analizowanych populacjach, co w połączeniu z analizą biometryczną wskazuje na efekt plejotropowy genu półkarłowatości. Ponadto w tym samym rejonie genomu wykryto QTL warunkujące masę tysiąca ziaren i masę ziarna z kłosa, ale tylko w populacji SSD co sugeruje, że te dwie cechy plonotwórcze nie są efektem plejotropowym genu półkarłowatości.

Wszystkie nowe informacje prezentowane w autoreferacie dotyczące locus *sdw1/denso* pozwolą na falsyfikację lub confirmację doniesień badawczych dotyczących jego plejotropowego działania na inne cechy oraz przyczynią się do poszerzenia aktualnego stanu wiedzy z tego zakresu, a w konsekwencji skutecznego wykorzystywania tego genu w programach hodowlanych.

Najważniejsze osiągnięcia poznawcze i aplikacyjne przeprowadzonych badań:

- uzyskanie populacji linii DH z mieszańców F_1 , a więc odzwierciedlających zmienność wynikającą z jednej rundy rekombinacji oraz linii SSD_{F_6} , których zmienność jest wynikiem 6 rund wraz z fenotypowaniem populacji w doświadczeniach szklarniowych jak i polowych,
- wykazanie istotnych różnic na poziomie morfo-anatomicznym między rekombinacyjnymi liniami jęczmienia z genem półkarłowatości i o normalnym typie wzrostu w oparciu o analizę obrazów uzyskanych z mikroskopu świetlnego,
- identyfikacja białek związanych z efektem fenotypowym locus *sdw1/denso*; badania te stanowią pierwsze analizy proteomiczne białek węzła krzewienia w różnych stadiach i typach młodocianego wzrostu linii jęczmienia,
- skonstruowanie mapy genetycznej fragmentu chromosomu 3H jęczmienia w oparciu o markery mikrosatelitarne zlokalizowane blisko locus *sdw1/denso* oraz identyfikacja QTL w tym rejonie,
- poszerzenie zakresu wiedzy o zależnościach między typem wzrostu siewek jęczmienia, występowaniem genu półkarłowatości *sdw1* a niektórymi cechami roślin w stadium dojrzałości jako wynik sprzężeń bądź plejotropii.

Piśmiennictwo:

- Andersen J. R., Lübberstedt T. 2003. Functional markers in plants. *Trends in Plant Science* 8:554-560.
- Barbacki S., Caliński T., Surma M., Kurhańska G., Adamski T., Kaczmarek Z., Karczewska A., Dobek A., Jeżowski S. 1978. Transgressions in barley (*Hordeum sativum* Jess.) 7a. Transgressions of F6 and F7 hybrids Burea × Brown. *Genet. Pol.* 19:403-421.
- Barua U.M., Chalmers K.J., Thomas W.T.B., Hackett C.A., Lea V., Jack P., Forster B.P., Waugh R., Powell W. 1993. Molecular mapping of genes determining height, time to heading, and growth habit in barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 36:1080-1087.
- Bouma J. 1967. New variety of spring barley "Diamant" in Czechoslovakia. In: *Induzierte Mutationen und ihre Nutzung*, Erwin Baur Gedächtnisvorlesungen IV, 1966, Abh. Dt. Akad. Wiss. Berl., Akademie-Verlag, Berlin, 2:177-182.
- Bjørnastad A., Skinnnes H., Thoresen K. 1993. Comparisons between doubled haploid lines produced by anther culture, the *Hordeum bulbosum*-method and lines produced by single seed descent in barley crosses. *Euphytica* 66:135-144.
- Chen K., Tian S., Yandell B.S., Kaeppeler S.M., An Y. 2010. Loss-of-function of DELLA protein SLN1 activates GA signaling in barley aleurone. *Acta Physiol. Plant.* 32:789-00.
- Chono M., Honda I., Zeniya H., Yoneyama K., Saisho D., Takeda K., Takatsuto S., Hoshino T., Watanabe Y. 2003. A semidwarf phenotype of barley *uzu* results from a nucleotide substitution in the gene encoding a putative brassinosteroid receptor. *Plant Physiol.* 133:1209-1219.
- Dahleen L.S., Vander Wal L.J., Franckowiak J.D. 2005. Characterization and Molecular Mapping of Genes Determining Semidwarfism in Barley. *J. Hered.* 96(6):654-662.
- Dobek A., Kaczmarek Z., Kielczewska H., Łuczkiwicz T. 1978. Podstawy i założenia analizy statystycznej krzyżówek diallelicznych. II. Analiza genetyczna. Ósme Colloquium Metodologiczne z Agro-Biometrii. PAN, Warszawa: 146-168.
- Grausgruber H., Bointner H., Tumpold R., Ruckenbauer P. 2002. Genetic improvement of agronomic and qualitative traits of spring barley. *Plant Breed.* 121:411-416.
- Griffing B. 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing system. *Aust. J. Biol. Sci.* 9:463-492.
- Haahr V., von Wettstein D. 1976. Studies of an induced, high-yielding dwarf-mutant of spring barley. *Barley Genetics III. Proceedings of the Third International Barley Genetics Symposium, Garching 1975*. Verlag Karl Thieme, Munich: 215-218.
- Hayes P.M., Blake T., Chen T.H.H., Tragoonrun S., Chen F., Pan A., Liu B. 1993. Quantitative trait loci on barley (*Hordeum vulgare* L.) chromosome 7 associated with components of winter hardiness. *Genome* 36:66-71.
- Hedden P., Kamiya Y. 1997. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:431-460.
- Hellewell K.B., Rasmusson D.C., Meagher M.G. 2000. Enhancing yield of semi dwarf barley. *Crop Sci.* 40:352-358.
- Jansen R., Nap J.P. 2001. Genetic allogenomics: the added value from segregation. *Trends in Genetics* 17:338-391.

- Jia Q., Zhang J., Wescott S., Zhang X-Q., Bellgard M., Lance R., Li Ch. 2009. GA-20 oxidase as a candidate for the semidwarfgenes*dw1/denso* in barley. *Func. Integr. Genomics* 9:255-262.
- Jia, Q., Zhang X.Q., Westcott S., Broughton S., Cakir M., Yang Y., Lance R., Li C. 2011. Expression level of a gibberellin 20-oxidase gene is associated with multiple agronomic and quality traits in barley. *Theor. Appl. Genet.* 122:1451-1460.
- Jinks J.L., Pooni H.S. 1976. Predicting the properties of recombinant inbred lines derived by single seed decent. *Heredity* 36(2):253-266.
- Laurie D.A., Pratchett N., Romero C., Simpson E., Snape J.W. 1993. Assignment of the *denso* dwarfing gene to the long arm of chromosome 3H of barley by use of RFLP markers. *Plant Breed.* 111:198-203.
- Li J.Z., Huang X.Q., Heinrichs F., Ganai M.W., Röder M.S. 2006. Analysis of QTLs for yield components, agronomic traits, and disease resistance in advanced backcross population of spring barley. *Genome* 49(5):454-66.
- Mather K., Jinks J.L. 1982. *Biometrical Genetics* (3rd ed.). Chapman and Hall, London.
- Mickelson H.R., Rasmusson D.C. 1994. Genes for short stature in barley. *Crop Sci.* 34:1180-1183.
- Miralles D.J., Calderini D.F., Pomar K.P., D'Ambrogio A. 1998. Dwarfing genes and cell dimensions in different organs of wheat. *J. Exp. Bot.* 49:1119-1127.
- Peng J., Richards D.E., Hartley N.M., Murphy G.P., Devos K.M., Flintham J.E., Beales J., Fish L. J., Worland A.J., Pelica F., Sudhakar D., Christou P., Snape J.W., Gale M.D., Harberd N.P. 1999. "Green revolution" genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400:256-261.
- Poulsen D.M.E., Henry R.J., Johnston R.P., Irwin J.A.G., Rees R.G. 1995. The use of bulk segregant analysis to identify a RAPD marker linked to leaf rust resistance in barley. *Theor. Appl. Genet.* 91(2):270-273.
- Rasmussen D.C., Bantari E.E., Lambert J.W. 1973. Registration of M21 and M22 semidwarf barley germplasm. *Crop Sci.* 13:777.
- Saisho D., Tanno K., Chono M., Honda I., Kitano H., Takeda K. 2004. Spontaneous brassinolide-insensitive barley mutants 'uzu' adapted to east Asia. *Breed. Sci.* 54:409-416.
- Snape R.W., Simpson E. 1981. The genetical expectations of doubled haploid lines derived from different filial generations. *Theor. Appl. Genet.* 60:123-128.
- Speulman E., Salamini F. 1995. GA₃-regulated cDNAs from *Hordeum vulgare* leaves. *Plant Mol. Biol.* 28:915-926.
- Surma M. 1996. Biometryczno-genetyczna analiza cech ilościowych mieszańców i linii podwojonych haploidów jęczmienia jarego. Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań. Rozprawy i Monografie nr 3.
- Surma M., Adamski T., Kaczmarek Z., Kapała A. 1998. Frequency of transgression and gene distribution in barley doubled haploid populations from first and second cycle hybrids. *J. Appl. Genet.* 39(3):237-247.
- Thomas W.T.B., Newton A.C., Wilson A., Meyer R.C., Young G.R., Lawrence P.E. 2010. QTLs for disease resistance mapped in Derkado x B83-12/21/5. *Barley genetics VIII In: Proceedings of the 8th International Barley Genetics Symposium, Adelaide: 186-188.*
- Thomas W.T.B., Powell W., Swanston J.S. 1991. The effects of major genes on quantitatively varying characters in barley. 4. The *GPert* and *denso* loci and quality characters. *Heredity* 66:381-389.

- Thomas W.T.B., Powell W., Waugh R., Chalmers K.J., Barua U.M., Jack P., Lea V., Forster B.P., Swanston J.S., Ellis R.P. 1995. Detection of quantitative trait loci for agronomic, yield, grain and disease characters in spring barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 91:1037-1047.
- Thornsberry J. M., Goodman M. M., Doebley J., Kresovich S., Nielsen D., Buckler E. S. 2001. *Dwarf8* polymorphism associate with variation in flowering time. *Nat. Genet.* 28:286-289.
- Tinker N. A., Mather D. E., Rosnagel B. G., Kasha K. J., Kleinhofs A., Hayes P. M., Falk D. E., Ferguson T., Shugar L. P., Legge W. G., Irvine R. B., Choo T. M., Briggs K. G., Ullricg S. E., Franckowiak J. D., Blake T. K., Graf R. J., Dofing S. M., SaghaiMaroof M. A., Scoles G. J., Hoffman D., Dahleen L. S., Kilian A., Chen F., Biyashev R.M., Kudrna D., Steffenson A. 1996. Regions of the genome that affect agronomic performance in two-row barley. *Crop Sci.* 36:1053-1062.
- Wenzel C.I., Chandler P.M., Cunningham R.B., Passioura J.B. 1997. Characterization of the leaf epidermis of barley (*Hordeum vulgare* L. 'Himalaya'). *Ann. Bot.* 79:41-46.
- Yin X., Stam P., JohanDourleijn C., Krop M.J. 1999. AFLP mapping of quantitative trait loci for yield determining physiological characters in spring barley. *Theor. Appl. Genet.* 99:244-253.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych).

Studia wyższe magisterskie ukończyłam w 1999 roku na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, uzyskując tytuł magistra biologii o specjalności biologia molekularna. Pracę magisterską pt.: „Izolacja ludzkiego genu tRNA^{Leu} zawierającego intron”, wykonałam pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej w Zakładzie Ekspresji Genów Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

W październiku 1999 roku zostałam słuchaczem Studium Doktoranckiego przy Wydziale Biologii UAM w Poznaniu. Pracę doktorską pt.: „Zależność między zróżnicowaniem genetycznym form rodzicielskich a częstością efektów transgresji u jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.)”, wykonałam pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Surmy w Pracowni Genetyki Ilościowej Instytutu Genetyki Roślin PAN. Stopień doktora nauk rolniczych, dyscyplina – agronomia, uzyskałam 24 lutego 2005 roku, a moja praca doktorska została wyróżniona przez Radę Naukową IGR PAN. Z dniem 1 marca 2005 zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Pracowni Genetyki Ilościowej IGR PAN. Od 1 stycznia 2013 roku po zmianach struktury organizacyjnej IGR PAN pracuję w Zakładzie Biotechnologii, Zespół Fenotypowania i Genotypowania Zbóż.

Szczegółowy wykaz mojego dorobku naukowego zamieściłam w załączniku pt.: „Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych,

współpracy naukowej i popularyzacji nauki”. Poniżej przedstawiam skrócone zestawienie ważniejszych osiągnięć:

- Liczba prac opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR): **17**
- Sumaryczny *impact factor* według listy JCR, zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku prac opublikowanych w roku 2013 i 2014 uwzględniono dostępny IF z roku 2012): **IF = 17,331**
- Sumaryczna liczba punktów MNiSW według uaktualnionej w 2012 roku listy: **342**
- Indeks Hirsha według bazy Web of Science: **h = 4**
- Liczba realizowanych projektów badawczych: **3 UE, 3 KBN/MNiSW/NCN, 7 MRiRW**
- Liczba wygłoszonych referatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych: **8**
- Liczba pozostałych komunikatów prezentowanych na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych: **43**

W trakcie realizacji pracy doktorskiej odbyłam dwumiesięczny staż krajowy w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie oraz miesięczny staż zagraniczny w Laboratorium Biotechnologii Florimond Desprez Cappelle-en-Pévèle we Francji. Po uzyskaniu stopnia doktora odbyłam dwa staże zagraniczne: w Federal Centre for Breeding Research on Cultivated Plants, Institute of Epidemiology and Resistance Resources, Aschersleben, Niemcy i w Federal Centre for Breeding Research on Cultivated Plants Institute of Epidemiology and Resistance Resources, Quedlinburg, Niemcy o łącznej długości 3 miesiące. Staże zagraniczne związane były z doskonaleniem technik otrzymywania linii homozygotycznych jak również poszerzeniem wiedzy i umiejętności w zakresie badań molekularnych zbóż.

Byłam członkiem komitetu organizacyjnego dwóch ogólnopolskich konferencji naukowych. W latach 2007-2010 byłam sekretarzem Kapituły Nagrody Naukowej z Zakresu Genetyki Roślin im. Stefana Barbackiego. Mój dorobek naukowy został wyróżniony indywidualną nagrodą II-stopnia Dyrektora Instytutu Genetyki Roślin PAN za osiągnięcia publikacyjne 2012 roku.

W trakcie pracy w IGR PAN dwukrotnie brałam udział w przygotowaniu graficznym i merytorycznym informatora z okazji 50- i 60-lecia Instytutu. Prowadziłam szkolenia i

praktyki dla studentów i doktorantów z zakresu badań molekularnych, jak i obliczeń bioinformatycznych. Sprawowałam opiekę naukową nad pracami magisterskimi, a obecnie jestem promotorem pomocniczym mgr inż. Krzysztofa Mikołajczaka. Aktualnie jestem w Komitecie Redakcyjnym czasopism: Biohelikon: Plant Physiology (<http://biohelikon.org/bppEbmembers/6>), Journal of Applied Biotechnology (<http://www.macrothink.org/journal/index.php/jab/about/editorialTeam>) oraz na oficjalnej liście recenzentów czasopisma Biometrical Letters (<http://www.au.poznan.pl/bl/>).

Dominującym nurtem w tematyce badawczej są biotechnologiczne i biometryczne metody w generowaniu, utrwalaniu i charakteryzowaniu zmienności roślin, co w szczególności dotyczy zbóż z głównym naciskiem na jęczmień. W ramach Projektu POLAPGEN-BD jestem kierownikiem zadania nr 2 „Mapy genetyczne i lokalizacja QTL związanych z odpornością jęczmienia na niedobór wody”, gdzie prowadzone jest fenotypowanie populacji RIL jęczmienia jarego w warunkach niedoboru wody i przy optymalnej wilgotności podłoża. Równolegle prowadzone są analizy molekularne z zastosowaniem markerów mikrosatelitarnych. Stworzono mapę szkieletową, która została zagęszczona markerami typu SNP. Obserwacje fenotypowe oraz utworzone mapy genetyczne służą innemu zespołom badawczym w ramach Projektu, które analizują te same populacje w aspekcie zmian fizjologicznych oraz zmian w proteomie i metabolomie, jakie zachodzą w roślinach pod wpływem niedoboru wody.

Swoje doświadczenie związane z fenotypowaniem roślin będę rozwijać w ramach projektu z European Plant Phenotyping Network w IPK Gatersleben w Niemczech, którego jestem koordynatorem (od sierpnia 2014 roku) oraz jako osoba odpowiedzialna za Centrum Fenotypowania Roślin, które planuje się utworzyć przy Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu, wyposażonego w nowoczesne urządzenia służące do ciągłego mierzenia licznych cech fenotypowych na dużych materiałach roślinnych.

Tematyka badawcza realizowana na innym niż jęczmień materiale roślinnym

Uczestniczyłam w badaniach nad zastosowaniem metod biotechnologicznych do szybkiej homozygotyzacji roślin mieszańcowych, jako alternatywnych do systemu DH. Obiektami badań są mieszańce pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.), grochu siewnego (*Pisum sativum* L.), łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.) i łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.). Stosowana jest metoda pojedynczego ziarna w połączeniu z kulturą *in vitro* zarodków. W badaniach nad pszenicą i jęczmieniem porównywane są oba systemy zarówno pod względem

efektywności, jak i zakresu zmienności otrzymanych linii. W przypadku roślin strączkowych badania koncentrują się nad określeniem optymalnego stadium rozwoju zarodków przeznaczanych do kultury *in vitro* oraz znalezieniem optymalnego składu pożywek i warunków fizycznych kultury. Przeprowadzone dotychczas badania wykazały, że przy zaproponowanej technice czas potrzebny dla uzyskania jednego pokolenia jęczmienia i grochu wynosi 80-90 dni, co pozwala otrzymać 4 pokolenia w ciągu roku, natomiast w przypadku pszenicy ozimej oraz obu gatunków łubinów 105-120 dni, co umożliwia uzyskanie 3 pokoleń w ciągu roku. Zastosowanie proponowanego podejścia w praktyce pozwoli na otrzymanie w krótkim czasie (ok. 2-3 lat) populacji linii homozygotycznych do badań genetycznych lub prac hodowlanych. Warunkiem przydatności populacji linii SSD do badań genetycznych jest, aby reprezentowały one pełen zakres zmienności pod względem interesujących cech i właściwości, a także poprawność segregacji.

Brałam również udział w badaniach nad określeniem związku między zmiennością cech reologicznych a wariantowością alleli kodujących białka puroindolinowe oraz wysoko- i niskocząsteczkowe białka gluteninowe u pszenicy. Prowadzone były również badania dotyczące adaptacji pszenicy do różnych warunków środowiska, w zależności od ich reakcji fotoperiodycznej. Równoległe prowadzono analizy molekularne, dzięki którym stwierdzono zależność pomiędzy występowaniem zmutowanego allelu w locus *Ppd-D1* związanego z niewrażliwością na reakcję fotoperiodyczną, a przyspieszeniem terminu kłoszenia od 2-10 dni w stosunku do pozostałych odmian.

W tym okresie grupa badawcza, w której pracuję, nawiązała szeroką współpracę z placówkami naukowymi, jak i stacjami hodowli roślin: Instytutem Agrofizyki PAN w Lublinie, Instytutem Fizjologii Roślin im. F. Górskiego PAN w Krakowie, Instytutem Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, Instytutem Środowiska Rolniczego i Leśnego PAN w Poznaniu, Instytutem Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, Zakładem Ekspresji Genów Zakładu Botaniki Ogólnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Katedrą Fizjologii Roślin Wydziału Ogrodniczego Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Katedrą Fizjologii Roślin Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, Danko Hodowlą Roślin Sp. z o.o., Poznańską Hodowlą Roślin Sp. z o.o., Hodowlą Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, Hodowlą Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR oraz Hodowlą Roślin Rolniczych „Nasiona Kobierzyc” Sp. z o.o. Współpraca ta trwa do dziś, a jej owocem są wspólne projekty badawcze i publikacje.

Poza pracą naukową realizuję swoje pasje, a wśród nich największą, jaką jest bieganie. Przebiegłam kilka maratonów oraz ultramaratonów, w tym jeden z najtrudniejszych biegów górskich zwany Biegiem Rzeźnika na dystansie 80 km. Wciąż największe wyzwania biegowe przede mną.