Załącznik 3

AUTOREFERAT

Charakterystyka molekularnego podłoża biosyntezy i akumulacji alkaloidów u łubinu wąskolistnego oraz profili alkaloidów w nasionach łubinów Starego Świata

dr Magdalena Kroc

Zakład Genomiki Roślin Strączkowych

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Poznań, 2022

Spis treści

1. Imię i nazwisko ... 2
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne ... 2
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych ... 2
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.) ... 2
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego ... 3
4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (wg kolejności omawiania) ... 3
4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników ... 5
4.3.1. Wprowadzenie i cel naukowy ... 5
4.3.2. Omówienie wyników badań ... 8
4.3.3. Podsumowanie osiągnięcia naukowego ... 20
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej 20
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę ... 26
7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej ... 28

1. Imię i nazwisko

Magdalena Kroc
https://orcid.org/**0000-0001-5468-715X**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne

(z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej).

Stopień DOKTORA NAUK ROLNICZYCH w dziedzinie agronomii, 14 grudnia 2010 r., Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu.
Tytuł rozprawy doktorskiej: Lokalizacja markerów zdefiniowanych sekwencyjnie i loci cech ilościowych oraz mapowanie porównawcze genomu łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.). **Promotor:** prof. dr hab. Wojciech Święcicki

Tytuł MAGISTRA BIOLOGII, w zakresie biologia z podstawami ochrony środowiska, 16 grudnia 2003, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Szczeciński.
Tytuł pracy magisterskiej: Wpływ wieku i ciąży na wybrane wskaźniki hematologiczne i stężenie elektrolitów krwi krów i jałowic. **Promotor:** dr hab. Wiesława Orowicz

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

1.01.2011 – obecnie	**adiunkt**, Zakład Genomiki Roślin Strączkowych (poprzednia nazwa: Zakład Genomiki, Zespół Genomiki Porównawczej Roślin Strączkowych), Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu • urlop macierzyński: 7.12.2012 - 24.05.2013 • urlop macierzyński i rodzicielski: 22.10 2014 – 20.10.2015
1.10.2009 – 31.12.2010	**specjalista biolog**, Zakład Genomiki, Zespół Genomiki Porównawczej Roślin Strączkowych, Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)

(Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnieć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej).

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl czterech artykułów naukowych opublikowanych w latach 2019 – 2021 i powiązanych tematem:

„Charakterystyka molekularnego podłoża biosyntezy i akumulacji alkaloidów u łubinu wąskolistnego oraz profili alkaloidów w nasionach łubinów Starego Świata".

4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (wg kolejności omawiania)

* autor korespondencyjny

H1 **Kroc M.***, Koczyk G., Kamel K.A., Czepiel K., Fedorowicz-Strońska O., Krajewski P., Kosińska J., Podkowiński J., Wilczura P., Święcicki W. (**2019**). Transcriptome-derived investigation of biosynthesis of quinolizidine alkaloids in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) highlights candidate genes linked to *iucundus* locus. *Scientific Reports* 9:2231.

IF: 3,998	MEiN: 140	Liczba cytowań: 25

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował: (1) współtworzenie koncepcji badań i manuskryptu, (2) udział w wyborze badanych genów kandydackich syntezy i akumulacji alkaloidów, (3) opracowanie części markerów zdefiniowanych sekwencyjnie na podstawie uzyskanych danych transkryptomicznych, (4) mapowanie genetyczne oraz mapowanie loci cech ilościowych, (5) decydujący udział w wyborze stabilnych genów referencyjnych do badań ekspresji genów, (6) udział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników, (7) udział w opracowaniu wyników w formie graficznej, (8) przygotowanie manuskryptu publikacji, (9) korespondencję z Redaktorem czasopisma, sporządzenie odpowiedzi na zastrzeżenia recenzentów oraz przygotowanie poprawionych i finalnej wersji manuskryptu.

Publikacja powstała w wyniku realizacji kierowanych przeze mnie zadań badawczych, w ramach Wieloletnich Programów Rządowych Rady Ministrów, realizowanych w latach 2011–2015 (Zadanie 2.8) oraz 2016-2020 (Zadanie 2.2).

H2 **Kroc M.***, Czepiel K., Wilczura P., Mokrzycka M., Święcicki W. (**2019**). Development and validation of a gene-targeted dCAPS marker for marker-assisted selection of low-alkaloid content in seeds of narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Genes* 10 (6): 428

IF: 3,759	MEiN: 100	Liczba cytowań: 14

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował: (1) opracowanie koncepcji badań i manuskryptu (2) opracowanie metodyki dotyczącej zaprojektowania markera dCAPS i weryfikacji jego użyteczności w selekcji genotypów łubinu wąskolistnego o niskiej zawartości alkaloidów w nasionach, (3) wykonanie części prac eksperymentalnych związanych z opracowaniem i walidacją markera, (4) udział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników,

(5) udział w opracowaniu uzyskanych wyników w formie graficznej, (6) przygotowanie manuskryptu publikacji, (7) korespondencję z Redaktorem czasopisma, sporządzenie odpowiedzi na zastrzeżenia recenzentów oraz przygotowanie poprawionych i finalnej wersji manuskryptu.

Publikacja powstała w wyniku realizacji kierowanych przeze mnie zadań badawczych, w ramach Wieloletnich Programów Rządowych Rady Ministrów, realizowanych w latach 2011–2015 (Zadanie 2.8) oraz 2016-2020 (Zadanie 2.2).

H3 Czepiel K., Krajewski P., Wilczura P., Bielecka P., Swiecicki W., **Kroc M***. (**2021**). Expression profiles of alkaloid-related genes across the organs of narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) and in response to anthracnose infection. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (5): 2676

IF: 6,208	MEiN: 140	Liczba cytowań: 4

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował: (1) współtworzenie koncepcji badań i manuskryptu (2) udział w analizie i interpretacji wyników, (3) udział w przygotowaniu manuskryptu publikacji, (4) korespondencję z Redaktorem czasopisma, sporządzenie odpowiedzi na zastrzeżenia recenzentów oraz przygotowanie poprawionych i finalnej wersji manuskryptu.

Publikacja powstała w wyniku realizacji projektu Preludium (nr 2014/13/N/NZ9/03943), finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Projekt ten kierowany był przez doktorantkę, mgr K. Czepiel, w przewodzie doktorskim której pełnię rolę promotora pomocniczego. Ponadto, część wyników uzyskana została w ramach projektu MRiRW, Postęp Biologiczny (nr. 41, 2014-2020), którego byłam wykonawcą (kierownik prof. dr hab. W. Święcicki).

H4 Święcicki W., Czepiel K., Wilczura P., Barzyk P., Kaczmarek Z., **Kroc M***. (**2019**). Chromatographic fingerprinting of the Old World Lupins seed alkaloids: a supplemental tool in species discrimination. *Plants* 8 (12): 548

IF: 2,762	MEiN: 70	Liczba cytowań: 4

Mój wkład w przygotowanie publikacji obejmował: (1) współtworzenie koncepcji badań i manuskryptu (2) udział w pozyskaniu materiału do badań, (3) udział w analizie i interpretacji wyników, (4) udział w opracowaniu wyników w formie graficznej, (5) udział w przygotowaniu manuskryptu publikacji, (6) korespondencję z Redaktorem czasopisma, sporządzenie odpowiedzi na zastrzeżenia recenzentów oraz przygotowanie poprawionych i finalnej wersji manuskryptu.

Publikacja powstała w wyniku realizacji kierowanych przeze mnie zadań badawczych, w ramach Wieloletnich Programów Rządowych Rady Ministrów, realizowanych w latach 2011–2015 (Zadanie 2.8) oraz 2016-2020 (Zadanie 2.2).

Sumaryczne wskaźniki bibliometryczne dla osiągnięcia naukowego:

- Impact Factor (IF) = 16,727 (zgodnie z rokiem opublikowania pracy)
- Punktację MEiN = 450 (zgodnie z komunikatem Ministra Edukacji i Nauki z dnia 21.12.2021 r.)
- Liczba cytowań wg bazy Web of Science = 47 (stan na dzień 11.09.2022 r.)

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

4.3.1. Wprowadzenie i cel naukowy

Łubiny należą do rodzaju *Lupinus* L., w obrębie podrodziny Faboideae, rodziny bobowatych (Fabaceae), będącej trzecią co do wielkości rodziną roślin okrytonasiennych. Rodzaj *Lupinus* jest bardzo zróżnicowaną i szeroko rozpowszechnioną grupą roślin, obejmujących zarówno gatunki jednoroczne, jak i wieloletnie, rosnące w wielu strefach klimatycznych (Gladstones, 1998). Szacuje się, że rodzaj *Lupinus* L. obejmuje około 280 gatunków, a na podstawie centrów pochodzenia wyróżniono dwie grupy gatunków (Gladstones, 1998). Pierwszą grupę stanowią tzw. Łubiny Starego Świata (ang. Old World Lupins, OWL), występujące w rejonie basenu Morza Śródziemnego i Afryki. Drugą grupę tworzą gatunki tzw. Nowego Świata (ang. New World Lupins, NWL), występujące na obu kontynentach amerykańskich. Ponad 90% gatunków rodzaju *Lupinus* należy do NWL, która reprezentuje bardzo dużą różnorodność form i jest grupą zdecydowanie mniej poznaną (Aïnouche i in., 2004). Natomiast do OWL zalicza się 13-15 jednorocznych i w większości samopylnych gatunków (Święcicki i in., 1996; Gladstones, 1998; Pascual, 2004). Gatunki OWL dzielone są pod względem struktury ich okrywy nasiennej na szorstkonasienne (sekcja *Scabrispermae*: *Lupinus anatolicus* Sw., *L. atlanticus* Glads., *L. cosentinii* Guss., *L. digitatus* Forsk., *L. palaestinus* Boiss., *L. pilosus* Murr., *L. princei* Harms i *L. somaliensis* Baker) i gładkonasienne (sekcja *Malacospermae*: *L. albus* L., *L. angustifolius* L., *L.* x *hispanicoluteus* Swiec. et Swiec, *L. hispanicus* Boiss. & Reut., *L. luteus* L. i *L. micranthus* Guss.) (Święcicki i in., 1996; Gladstones, 1998; Święcicki i in., 1999). Dodatkowo, stosunkowo niedawno opisany gatunek *L. mariae-josephi* wykazuje cechy pośrednie dla obu grup (Pascual, 2004; Mahé i in., 2011). Łubiny szorstkonasienne poza podobieństwem morfologicznym i biochemicznym tworzą monofiletyczną grupę w analizach filogenetycznych, a prace hodowlane wskazują na możliwość krzyżowania jej przedstawicieli (np. *L. atlanticus*, *L. cosentinii* i *L. pilosus*) (Roy i Gladstones, 1988; Cowling i in., 1998; Aïnouche i in., 2004). Łubiny gładkonasienne stanowią natomiast grupę zróżnicowaną, w obrębie której występują bariery krzyżowalności (Cowling i in., 1998; Aïnouche i in., 2004).

Co warto podkreślić, tylko cztery gatunki łubinów znalazły szersze zastosowanie w uprawie. Trzy gatunki uprawne należą do OWL tj. łubin wąskolistny (*L. angustifolius*, 2n = 40; ang. narrow-leafed lupin, NLL), łubin biały (*L. albus*, 2n = 50) i łubin żółty (*L. luteus*, 2n = 52), czwartym natomiast jest, należący do NWL, łubin andyjski (*L. mutabilis* L., 2n = 48) (Cowling i in., 1998). Nasiona uprawnych gatunków łubinów stanowią przede wszystkim cenne źródło białka (zawartość ok. 30 - 45%) w żywieniu zwierząt i ludzi. W ostatnich latach doceniana jest także ich korzystna zawartość i jakość tłuszczów, z dużym udziałem nienasyconych kwasów tłuszczowych (Sbihi i in., 2013; Rybiński i in., 2018). Uważa się również, że spożywanie nasion łubinów może mieć potencjalne korzyści zdrowotne np. za sprawą błonnika obniżającego poziom cholesterolu, czy tokoferoli wykazujących działanie ochronne na układ krwionośny (Boschin i Arnoldi, 2011; Fontanari i in., 2012). Uprawa łubinów zapewnia ponadto korzyści związane z ich zdolnością do symbiozy z asymilującymi azot bakteriami brodawkowymi

(*Bradyrhizobium*) (Cowling i in., 1998). Dzięki temu nie wymagają one mineralnego nawożenia azotowego, a wykorzystywane jako poplon poprawiają żyzność i kulturę gleby. W związku z powyższym, stosowanie łubinów w zmianowaniu wykorzystywane jest z powodzeniem do przerywania monokultury zbożowej.

Główną przeszkodą w szerszym wykorzystaniu nasion łubinów w żywieniu są gromadzone w nich alkaloidy, których wytwarzanie jest cechą specyficzną dla tej grupy roślin (Wink i in., 1995). Alkaloidy łubinowe są heterocyklicznymi metabolitami wtórnymi (Wink, 1988). Odmiany prymitywne i formy dzikie najczęściej cechuje wysoka zawartość tych związków w nasionach (do kilku % suchej masy nasion; % s.m. nasion). Uważa się, że w naturze alkaloidy stanowią rodzaj ochrony chemicznej przeciw patogenom (bakteryjnym, grzybowym, wirusowym), a nadawany przez nie gorzki smak zabezpiecza przed zwierzętami roślinożernymi (Wink, 1988; Lee i in., 2007). Z punktu widzenia wykorzystania nasion łubinów w żywieniu, gorzkie i mające działanie neurotoksyczne alkaloidy uznawane są jednak za związki antyżywieniowe. Mając na uwadze względy bezpieczeństwa, ustalono dopuszczalny limit zawartości alkaloidów w nasionach stosowanych w celach żywieniowych, który nie może przekraczać 0,02% s.m. nasion (Cowling i in., 1998). Z chemicznego punktu widzenia, łubiny syntetyzują głównie alkaloidy chinolizydynowe (ang. quinolizidine alkaloids, QA), których prekursorem jest L-lizyna. Ponadto, mogą wytwarzać wywodzące się z lizyny - alkaloidy piperydynowe (np. ammodendryna) oraz pochodzące od tryptofanu - alkaloidy indolowe (np. gramina). Większość gatunków łubinu posiada charakterystyczny profil alkaloidów, spośród których można wyróżnić tzw. alkaloidy główne (udział procentowy w całkowitej zawartości alkaloidów >1%) oraz tzw. alkaloidy dodatkowe (udział procentowy w całkowitej zawartości alkaloidów <1%) (Wink i in., 1995; Święcicki i in., 2019). Dane literaturowe wskazują, że synteza alkaloidów zachodzi w zielonych częściach rośliny, a następnie za pośrednictwem łyka są one transportowane do nasion (Lee i in., 2007; Czepiel i in., 2021).

Mimo istotnej roli, szlak biosyntezy alkaloidów został tylko częściowo scharakteryzowany, zarówno biochemicznie, jak i na poziomie genetycznym (Saito i in., 1993; Suzuki i in., 1994; Hirai i in., 2000; Okada i in., 2005; Bunsupa i in., 2011; Bunsupa i in., 2012b; Yang i in., 2017; Frick i in., 2018; Kroc i in., 2019b; Kroc i in., 2019a). Do tej pory zidentyfikowano tylko kilka genów zaangażowanych w ten proces, a regulacja akumulacji QA nadal wymaga wyjaśnienia. Pierwszym etapem biosyntezy QA jest dekarboksylacja L-lizyny do kadaweryny za pośrednictwem dekarboksylazy lizynowej (ang. lysine decarboxylase, *LDC*) (Bunsupa i in., 2012b). Kadaweryna, należąca do amin jest następnie przekształcana do 1-piperydyny, w reakcji katalizowanej przez oksydazę aminową (ang. *Lupinus angustifolius* copper amin oxidase, *LaCAO*) (Yang i in., 2017). W dalszej kolejności zachodzi spontaniczne zamknięcie łańcucha i utworzenie zasady Schiffa, a produkty biosyntezy QA, a także ich formy transportowe, powstają w procesie dalszych modyfikacji i przyłączania grup funkcyjnych (Facchini i St-Pierre, 2005; Schafer i Wink, 2009; Bunsupa i in., 2012a). Powstanie estrów QA katalizowane jest przez 13-hydroksymultifloryno/13-hydroksylupanino 0-tigloilotransferazę (ang. 13α-hydroxymultiflorine/13α-hydroxylupanine O-tigloyltransferase; *HMT/HLT*) (Okada i in., 2005). Ponadto, jako przypuszczalnie zaangażowaną w tworzenie form transportowych QA wskazano również acyltransferazę (ang. acyltransferase-like gene, *LaAT*) (Bunsupa i in., 2011).

Gatunkiem uprawnym łubinów, dla którego zebrano największe zasoby genomiczne, a także najszerszą wiedzę dotyczącą biosyntezy QA jest NLL. W trakcie dynamicznej i krótkiej historii udomowienia tego gatunku (ok. 150 lat) wprowadzono do hodowli genotypy niosące korzystne allele cech agronomicznych, w tym niską zawartość QA w nasionach. Spośród kilku, powstałych na drodze naturalnych mutacji recesywnych genów/loci warunkującą niską zawartość tych związków, w hodowli NLL najszersze zastosowanie znalazł allel *iucunuds*

(Święcicki i Święcicki, 1995; Kamel i in., 2016). Brak wystarczającej wiedzy dotyczącej biosyntezy i gromadzenia QA w nasionach, w tym nieznany mechanizm działania locus *iucundus*, ograniczają wytwarzanie nowych odmian o korzystnych walorach żywieniowych, do czasochłonnych metod klasycznej selekcji hodowlanej.

Wytworzenie dla gatunku NLL, mapującej populacji linii wsobnych (ang. recombinant inbred lines, RILs) z kombinacji krzyżówkowej pomiędzy niskoalkaloidową linią hodowlaną (83A:476) i wysokoalkaloidowym typem dzikim (P27255), umożliwiło opracowanie kolejnych, coraz bardziej zaawansowanych wersji mapy genetycznej (Nelson i in., 2006; Nelson i in., 2010; Kroc i in., 2014; Hane i in., 2017). Określenie położenia genetycznego loci warunkujących ważne cechy agronomiczne, w tym położenia locus *iucundus*, było podstawą do poszukiwania markerów bliskosprzężonych (Li i in., 2011). Bardziej zaawansowanego narzędzia do identyfikacji genów kandydackich dla cech użytkowych, dostarczyło zsekwencjonowanie referencyjnego genomu słodkiej odmiany NLL, Tanjil (Hane i in., 2017). Identyfikacja genów warunkujących ważne cechy agronomiczne stwarza możliwość opracowania markerów molekularnych użytecznych w selekcji hodowlanej (ang. marker-assisted selection, MAS). Z kolei zastosowanie MAS znacząco wpływa na efektywność i precyzję wyboru materiałów w programach hodowlanych, przyspieszając wytworzenie nowych odmian o pożądanych cechach (Varshney i in., 2015; Kage i in., 2016; Kamphuis i in., 2021).

Dla dalszego upowszechniania wykorzystania łubinów w żywieniu ludzi i zwierząt niezbędne jest **poznanie molekularnych podstaw szlaku biosyntezy alkaloidów, a także mechanizmów regulacyjnych procesu biosyntezy i gromadzenia tych związków**. Powyższe stanowiło nadrzędny cel badań będących przedmiotem przedstawianego osiągnięcia. Drugim celem było **przekrojowe scharakteryzowanie gatunków OWL pod względem alkaloidów obecnych w ich nasionach, a także oszacowanie możliwości wykorzystania profili alkaloidów do rozróżniania poszczególnych gatunków**.

Powyższe cele zostały osiągnięte w wyniku realizacji zadań cząstkowych, składających się na cykl publikacji związanych z przedstawionym osiągnięciem:

1. Identyfikacja genów kandydackich zaangażowanych w biosyntezę i akumulację QA u NLL (Publikacja **H1**).
2. Opracowanie i walidacja markera molekularnego przydatnego w selekcji hodowlanej NLL (Publikacja **H2**).
3. Analiza obiektów NLL, zidentyfikowanych w Polskiej Kolekcji *Lupinus*, jako reprezentujących inny niż powszechnie występujący mechanizm regulacji niskiej zawartości QA w nasionach (Publikacja **H2**).
4. Scharakteryzowanie profili ekspresji genów zaangażowanych w syntezę i akumulację QA w wybranych organach NLL w zestawieniu z oznaczoną dla tych organów zawartością QA (Publikacja **H3**).
5. Scharakteryzowanie profili ekspresji genów zaangażowanych w syntezę i akumulację QA w odpowiedzi na porażenie NLL grzybem fitopatogenicznym (*Colletotrichum lupini*) (Publikacja **H3**).
6. Charakterystyka składu ilościowego i jakościowego alkaloidów w nasionach gatunków OWL (Publikacja H4).

4.3.2. Omówienie wyników badań

H1 **Kroc M.***, Koczyk G., Kamel K.A., Czepiel K., Fedorowicz-Strońska O., Krajewski P., Kosińska J., Podkowiński J., Wilczura P., Święcicki W. (**2019**). Transcriptome-derived investigation of biosynthesis of quinolizidine alkaloids in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) highlights candidate genes linked to *iucundus* locus.
Scientific Reports 9: 2231.

Pierwszym etapem prowadzonych badań była identyfikacja genów kandydackich zaangażowanych w biosyntezę QA u gatunku NLL, na podstawie danych transkryptomicznych. W sekwencjonowaniu transkryptomu (RNA-seq, Illumina) uwzględniono genotypy o wysokiej i niskiej zawartości alkaloidów (łącznie 4 genotypy, włączając linie rodzicielskie populacji mapującej RIL: słodką 83A:476 i gorzką P27255). W badaniach przyjęto hipotezę, że geny zaangażowane w biosyntezę i akumulację QA ulegają podwyższonej ekspresji w miejscu ich syntezy, tj. zielonych częściach rośliny (Lee i in., 2007). Dlatego też zsekwencjonowano RNA liści, a jako transkryptom referencyjny wybrano genotyp gorzki (P27255). Połączenie wyników czterech indywidulnych metod złożenia krótkich odczytów sekwencjonowania Illumina zaowocowało uzyskaniem transkryptomu referencyjnego o wysokiej jakości, co potwierdzono oceną jego kompletności ortologicznej (BUSCO v. 3, na zbiorze jednokopijnych ortologów charakterystycznych dla roślin zielonych).

Na podstawie analizy ekspresji różnicowej zidentyfikowano następnie 550 transkryptów o minimum dwukrotnie wyższej ekspresji w genotypach gorzkich względem słodkich, przy założeniu kryterium obecności transkryptów w obu grupach fenotypowych. Wybór genów kandydackich do dalszych badań oparto głównie o wyniki przewidywania funkcji (w tym adnotację GO) związanej z metabolizmem wtórnym i jego regulacją u roślin (reprezentanci rodzin czynników transkrypcyjnych i kluczowych enzymów). Na podstawie transkryptomu referencyjnego wytypowano: 1) 10 genów ulegających ekspresji różnicowej (tj.: reduktaza cynamoilo-CoA (ang. cinnamoyl-CoA reductase, *CCR*), karboksyesteraza 1 (ang. carboxylesterase 1, *CES1L*), reduktaza dihydroflawonolowa (ang. flavanone reductase, *DFR1*), *LDC*, *LaCAO*, *LaAT*, 3-hydroksylaza flawanonowa (ang. flavanone-3-hydroxylase, *F3H*), dioksygenaza leukoantocyjanidynowa (ang. leucoanthocyanidin dioxygenase, *LDOX*), czynnik transkrypcyjny zależny od etylenu z rodziny AP2/ERF (ang. APETALA2/ethylene response transcription factor; *RAP2-7*), czynnik transkrypcyjny z rodziny MYB, 2) locus kandydacki o niezróżnicowanej ekspresji w bibliotekach RNA dla genotypów słodkich i gorzkich, ze względu na jego zweryfikowaną rolę w biosyntezie QA (*HMT/HLT*). Ponadto, dostępność wstępnej wersji genomu NLL (Hane i in., 2017) umożliwiła bezpośrednią analizę rejonu obejmującego locus *iucundus* w pseudochromosomie 7. Na tej podstawie wytypowano blisko sprzężony z locus *iucundus*, dodatkowy gen kandydacki, adnotowany jako syntaza 4-hydroksy-tetrahydrodipikolinianowa (*DHDPS*). Na dalszych etapach szczegółowo badano więc 12 genów kandydackich. Jako weryfikację wyników uzyskanych dla genów kandydackich w RNA-seq, przeprowadzono analizę ich relatywnej ekspresji z zastosowaniem techniki qPCR (ang. quantitative PCR, jakościowa analiza PCR w czasie rzeczywistym), w puli siedmiu gorzkich i siedmiu słodkich genotypów NLL. Zgodnie z oczekiwaniami jedenaście genów kandydackich charakteryzowało się istotnie wyższą ekspresją w genotypach gorzkich ($P<0,0001$; test Wilcoxona z poprawką Bonferroniego), podczas gdy ekspresja genu *HMT/HLT* nie była istotnie różna ($P = 0.003$, średnio 2,06× wyższa ekspresja u gorzkich).

Wyniki przeprowadzonego następnie mapowania genetycznego wykazały, że dwa spośród analizowanych genów kandydackich tj. *RAP2-7* (transkrypt P27255_008724, postFC 98.8, odpowiadający TanjilG_07628) i *DHDPS* (transkrypt P27255_011214, odpowiadający

TanjilG_017658, postFC 4.88), są zlokalizowane w rejonie locus *iucundus*, w grupie sprzężeń 7 (NLL-07). W toku mapowania wykazano, że *RAP2-7* kosegreguje z locus *iucundus*, natomiast *DHDPS* mapuje się w odległości 0,5 cM od *iucundus*. Co warto podkreślić, adnotacja funkcjonalna obu genów kandydackich wsparta wynikami qPCR/RNAseq, świadczy o istotnej roli tego rejonu genomu NLL w biosyntezie QA. Przedstawiciele czynników transkrypcyjnych z grupy AP2/ERF regulują bowiem biosyntezę różnych klas alkaloidów u roślin, natomiast homologi genów *DHDPS* typowo uczestniczą w jednym z etapów biosyntezy L-lizyny (prekursor QA) (Van Der Fits i Memelink, 2000; Shoji i in., 2010; Cardenas i in., 2016; Thagun i in., 2016; Udomsom i in., 2016). Pozostałe geny kandydackie zlokalizowano natomiast w grupach sprzężeń innych niż NLL-07. Dlatego też obecnie uzyskane wyniki sugerują, że geny biosyntezy QA nie są w genomie NLL zorganizowane w klastrze skupionym wokół locus *iucundus*. Wyniki poprzednich prac wspierają zarówno możliwość funkcjonowania rozproszonych genów w szlakach biosyntezy alkaloidów, jak i tworzenia skupisk różnorodnych, sprzężonych genów - wyspecjalizowanych klastrów biosyntetycznych (Shoji i in., 2010; Winzer i in., 2012; Itkin i in., 2013; Cardenas i in., 2016).

Co ciekawe, w dostępnej wersji złożenia genomu NLL (v1.0) (Hane i in., 2017) czynnik transkrypcyjny *RAP2-7* zidentyfikowano w kontigu nr 162, który nie został przypisany do żadnego z 20 pseudochromosomów NLL. Analiza struktury kontigu, jak i rejonu genomu obejmującego locus *iucundus* wykazała, że są to obszary obarczone licznymi błędami złożenia i sekwencjami powtarzalnymi, co mogło być przyczyną problemów z prawidłowym złożeniem tej części NLL-07. Dalszych informacji na temat struktury genów kandydackich *RAP2-7* i *DHDPS* dostarczyło mapowanie izoform transkryptu *in silico*. Wykazano, że gen *RAP2-7* zrekonstruowany na podstawie najdłuższej izoformy locus kandydackiego dla linii gorzkiej P27255_08724, składa się z ośmiu egzonów. Ponadto, porównanie sekwencji P27255_08724 z sekwencją homologiczną u linii słodkiej Tanjil (TanjilG_07628), umożliwiło identyfikację dwóch substytucji tj.: M48V i S196R (numeracja na podstawie sekwencji białkowej XP_019435537.1, zamieszczonej w basie RefSeq dla locus TanjilG_07628). Analogicznie, model genowy przewidziany dla *DHDPS* na podstawie locus kandydackiego P27255_011214 wskazał w jego strukturze 3 egzony. Wykazano również, że sekwencja genu *DHDPS* była obecna w dostępnej wersji genomu, natomiast w bazie NCBI TanjilG_17658 (LOC109352463) został re-adnotowany jako pseudogen. Porównanie sekwencji P27255_011214 i TanjilG_017658 ujawniło zmianę pojedynczego nukleotydu i pojedynczą delecję, powodującą przesunięcie ramki odczytu. Możliwe jest więc, że wykryta delecja guaniny, potencjalnie zmieniająca ramkę odczytu, może być dodatkowym czynnikiem różnicującym gorzkie i słodkie formy NLL.

W toku prowadzonych prac na mapie genetycznej NLL, po raz pierwszy zidentyfikowano także QTL, warunkujące całkowitą zawartość alkaloidów (ang. total alkaloid content, TAC), jak i udział procentowy poszczególnych alkaloidów głównych. Na podstawie pięcioletnich analiz zidentyfikowano łącznie 47 loci, z których większość mapowała się w przedziale mapy obejmującym locus *iucundus*, a tym samym *RAP2-7*. W rejonie *iucundus* zidentyfikowano stabilne w latach QTL dla TAC, wyjaśniające od 18,9 do 70,7% zmienności fenotypowej (LOD 7,8 – 27,8), a także QTL dla udziału procentowego angustifoliny, warunkujące 12,6 – 56,4% obserwowanej zmienności (LOD 3,9–21,7). W obu przypadkach allel pochodzący z linii dzikiej (P27255) był odpowiedzialny za podwyższenie wartości cech. Ponadto, w przedziale mapowym obejmującym locus *iucundus* zmapowano powtarzalne w latach QTL warunkujące procentowy udział izolupaniny (11,4–20,3% wyjaśnianej zmienności, LOD 3,6–6,9), a podwyższenie wartości cechy było warunkowane przez rodzicielską linię hodowlaną (83A:476). Kolokalizacja w rejonie locus *iucundus* niezależnych od środowiska QTL, które w znacznym zakresie tłumaczą obserwowaną zmienność fenotypową, stanowi kolejną

przesłankę, że gen leżący u ich podstawy, tj. kosegregujacy z locus *iucundus RAP2-7,* determinuje kluczowy etap biosyntezy/akumulacji QA. Inne powtarzalne w latach QTL zidentyfikowano jedynie w obszarze NLL-08 i warunkowały one udział procentowy izolupaniny (25,2–34,2% wyjaśnianej zmienności, LOD 7,2–9,9, podwyższenie wartości cechy warunkowane przez allel linii dzikiej). Co ciekawe, w tym przedziale mapowym zlokalizowano również gen kandydacki *CES1L*, którego homologi mają udokumentowany udział w metabolizmie wtórnym u roślin, włączając szlaki syntezy innych klas alkaloidów (Li i Smolke, 2016).

W celu wyjaśnienie powiązań ewolucyjnych pomiędzy czynnikiem transkrypcyjnym *RAP2-7* (P27255_008724) i przedstawicielami rodziny AP2/ERF u roślin zielonych, przeprowadzono następnie rekonstrukcję drzewa filogenetycznego (z wykorzystaniem dostępnych genomów Viridiplantae; metoda największej wiarygodności, ang. maximum likelihoood). Na zrekonstruowanym drzewie filogenetycznym uwzględniono grupę 65 sekwencji aminokwasowych AP2/ERF, obejmującą trzy kandydackie sekwencje NLL tj.: TanjilG_07628 (LOC109342033, scaffold_162), TanjilG_14185 (LOC109346040, pseudochromosom 4) i TanjilG_11298 (LOC109351048, pseudochromosom 6). Analiza ekspresji różnicowej względem sekwencji genomu (Hane i in., 2017) wykazała, że geny TanjilG_07628 i TanjilG_14185 ulegały podwyższonej ekspresji w liniach gorzkich (odpowiednio 65 i 500 razy), a w przypadku genu TanjilG_11298 nie wykazano istotnych różnic w ekspresji. Analiza powiązań filogenetycznych *RAP2-7* (TanjilG_07628) wykazała, że jest on homologiem czynników AP2/ERF, które ze względu na nietypową strukturę białkową były wyłączane z wcześniej publikowanych przekrojowych analiz filogenetycznych tj.: At3g54990 (SCHAFLMÜTZE, SMZ) i At2g39250 (SCHNARCHZAPFEN, SNZ) i At5g60120 (TARGET OF EARLY ACTIVATION TAGGED 2, TOE2) (Nakano i in., 2006; Udomsom i in., 2016). Co ciekawe, geny SMZ, SNZ i TOE2 znane są jako represory kwitnienia. Wiadomo również, że stanowią one geny docelowe dla microRNA miR172, a obniżenie ekspresji genu typu AP2 za sprawą miR172, skutkuje inicjacją kwitnienia (Aukerman i Sakai, 2003; Chen, 2004; Mathieu i in., 2009). Niemniej, przy obecnym stanie wiedzy nie ma przesłanek wskazujących na udział czynnika transkrypcyjnego *RAP2-7* w regulacji kwitnienia, a tym samym powiązanie zawartości alkaloidów z kwitnieniem u łubinów.

Podsumowując, w ramach kierowanych przeze mnie badań wykazaliśmy po raz pierwszy, że czynnik transkrypcyjny *RAP2-7*, należący do rodziny AP2/ERF jest silnym kandydatem dla *iucundus*, uznawanym za główny locus warunkujący niską zawartość QA w nasionach NLL. Uzyskane wyniki wskazują więc, że biosynteza QA u tego gatunku jest regulowana na poziomie transkrypcji. Odnotowane w genotypach słodkich obniżenie ekspresji genu *LDC*, uczestniczącego w pierwszym etapie szlaku (dekarboksylacja L-lizyny) wskazuje dalej, że regulacja biosyntezy QA ma miejsce na początku tego procesu. Wyniki prezentowanej pracy dostarczyły nowych danych przyczyniających się do wyjaśnienia szlaku biosyntezy i akumulacji QA u łubinu wąskolistnego i stanowią podstawę do dalszych badań nad zrozumieniem mechanizmów związanych z syntezą alkaloidów u łubinów. W dalszej perspektywie, zidentyfikowany czynnik transkrypcyjny może stanowić punkt wyjścia do kolejnych etapów prac badawczych związanych z lepszym zrozumieniem szlaku sygnalnego i sieci genów regulatorowych związanych z biosyntezą QA u NLL oraz być podstawą do opracowania markera molekularnego użytecznego w programach hodowlanych skierowanych na uzyskanie materiałów o niskiej zawartości QA w nasionach. Efekty publikacyjne badań prowadzonych w następstwie identyfikacji *RAP2-7* jako genu kandydackiego dla *iucundus*, są również elementami składowymi prezentowanego osiągnięcia naukowego (**Publikacja H2 i H3**).

H2 Kroc M.*, Czepiel K., Wilczura P., Mokrzycka M., Święcicki W. (**2019**). Development and validation of a gene-targeted dCAPS marker for marker-assisted selection of low-alkaloid content in seeds of narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Genes* 10 (6): 428.

Identyfikacja czynnika transkrypcyjnego *RAP2-7*, jako genu kandydackiego dla locus *iucundus* (Kroc i in., 2019a), umożliwiła rozpoczęcie kolejnego etapu badań, mającego na celu opracowanie prostego w użyciu markera molekularnego, użytecznego w MAS.

W pierwszej kolejności uzyskano sekwencję nukleotydową genu *RAP2-7,* o łącznej długości około 5200 par zasad (pz), w tym fragment o długości około 1500 pz powyżej części kodującej. Porównanie sekwencji nukleotydowej genu w grupie sześciu genotypów słodkich (niska zawartość QA warunkowana zmutowanym allelem *iucundus*, określana dalej jako „typ *iucundus*"; TAC 0,0005% - 0,0157% s.m. nasion) i sześciu genotypów gorzkich (zawartości QA warunkowana allelem dzikim *Iucundus*, określana dalej jako „typ *Iucundus*"; TAC 1,38% - 2,30% s.m. nasion), wykazało liczne zmiany polimorficzne typu SNP oraz insercje/delecje, które różnicowały badane genotypy. W sekwencji DNA powyżej sekwencji kodującej, nie zidentyfikowano zmian polimorficznych, które jednoznacznie różnicowałyby genotypy słodkie i gorzkie. Analiza sekwencji kodującej wykazała, natomiast że niesynonimiczna substytucja aminokwasu seryny na argininę (AGT\CGT, S196R), zlokalizowana w egzonie czwartym genu *RAP2-7*, jest jedyną konserwatywną mutacją tegoż genu, która różnicuje wszystkie genotypy słodkie od gorzkich oraz koreluje z oznaczoną TAC nasion.

Kluczową mutację punktową wykorzystano w projektowaniu markera kodominacyjnego typu dCAPS (ang. derived cleaved amplified polimorphic site), wprowadzając za pośrednictwem startera dodatkowe miejsce polimorficzne, które wraz interesującym nas SNP tworzyło miejsce cięcia dla enzymu restrykcyjnego *Taq*I (Neff i in., 1998). Opracowany marker nazwany został iuc_RAP2-7, a miejsce rozpoznawane przez enzym restrykcyjny było obecne tylko w sekwencji markera amplifikowanej w genotypach typu *Iucundus*.

Poprawność segregacji opracowanego markera iuc_RAP2-7 testowano następnie w zestawie 202 linii/genotypów NLL. Materiał pochodził z Polskiej Kolekcji *Lupinus* i reprezentował zarówno linie dzikie, jak i o różnym stopniu udomowienia. Nasiona badanych obiektów charakteryzowały się TAC w zakresie od 0,0005% do 2,8752% s.m. (Kamel i in., 2016). Ogółem, w badanej kolekcji uwzględniono 56 genotypów o bardzo niskiej zawartości alkaloidów w nasionach (nieprzekraczającej przyjętej normy ich bezpiecznego spożycia tj. 0,02% s.m. nasion). Ponadto, przeanalizowano 146 linii, których TAC nasion była wyższa od przyjętej normy. Analizując zawartość alkaloidów w nasionach, z uwzględnieniem stopnia udomowienia badanych genotypów wykazano, że najniższą średnią TAC zaobserwowano w grupie zarejestrowanych odmian rolniczych (0,27% s.m.), jednak tylko 33 spośród 76 indywidualnych genotypów tej klasy charakteryzowało się zawartością niższą niż 0,02% s.m. Najwyższa średnia TAC była odnotowana w grupie genotypów dzikich (1,59% s.m.), w tym u 59 z 60 linii przekraczała próg 0,02% s.m. nasion. Najbardziej zróżnicowane wartości TAC zaobserwowano natomiast w grupie genotypów reprezentujących ulepszone przez człowieka materiały hodowlane.

Normę bezpiecznej zawartości alkaloidów w nasionach łubinów, stosowanych w celach żywieniowych, wyznaczono w oparciu o toksyczność tych związków (0,02% s.m. nasion) (Cowling i in., 1998). Jak dotąd nie sprecyzowano jednak, jaka zawartość alkaloidów w nasionach jest wartością graniczną, nadal uwarunkowaną genotypem słodkim, a której przekroczenie może być tłumaczone, jako uwarunkowane genotypem gorzkim. Analiza segregacji markera iuc_RAP2-7 w kolekcji NLL wykazała, że produkt trawienia charakterystyczny dla linii typu *iucundus*, jak i leżący u podstawy SNP odnotowano u 102 obiektów, których TAC nasion wynosiła do 0,5% s.m. Produkt trawienia iuc_RAP2-7

warunkowany polimorfizmem typu *Iucundus*, jak i powiązany SNP, obserwowano natomiast u 97 obiektów, których nasiona zawierały co najmniej 0,9% s.m. alkaloidów. Ze względu na intensywnie prowadzoną selekcję hodowlaną w kierunku niskiej zawartości alkaloidów w nasionach, w polskiej kolekcji *Lupinus* nie zidentyfikowano genotypów charakteryzujących się TAC o wartościach pomiędzy 0,5% i 0,9% s.m. nasion, co nie pozwala na dokładne wyznaczenie progu detekcji opracowanego markera.

Co ciekawe, w badanej kolekcji zidentyfikowano także trzy genotypy tj. Brianskij-35 (nr kat. 95826), Brianskij-123 (nr kat. 95927) i Brianskij-237/83 (nr kat. 95928), pochodzące z Wszechrosyjskiego Instytutu Badawczego Łubinu w Briańsku, dla których wykazano niezgodność segregacji markera iuc_RAP2-7 z oznaczoną TAC. Obiekty te charakteryzowały się bowiem zawartością alkaloidów poniżej 0,5% s.m. nasion, a produkt trawienia enzymatycznego był charakterystyczny dla linii gorzkich *Iucundus*. W celu weryfikacji uzyskanych wyników porównano sekwencję genu *RAP2-7* dla linii pochodzących z Briańska, do sekwencji genotypów *iucundus* i *Iucundus*, wykorzystanych do projektowania markera iuc_RAP2-7. Na tej podstawie wykazano, że sekwencja *RAP2-7* genotypów z Briańska jest na całej długości znacznie bardziej podobna do linii wysokoalkaloidowych, włączając charakterystyczną dla linii *Iucundus* kluczową mutację. Nie wykazano natomiast miejsc polimorficznych, które byłyby unikatowe dla wszystkich trzech obiektów z Briańska, w porównaniu do gorzkich form typu *Iucundus*. W dalszej kolejności, dla genotypów z Briańska przeanalizowano profile ekspresji czterech genów zaangażowanych w biosyntezę QA tj. *RAP2-7*, *LDC*, *LaAT* i *LaCAO*, które porównano z profilami ekspresji genotypów reprezentujących regulację typu *iucundus* i *Iucundus*. Relatywny poziom ekspresji genu *RAP2-7* był u obiektów pochodzących z Briańska znacznie wyższy niż w liniach *iucundus*. W przypadku linii Brianskij-123 i Brianskij-237/83 poziom ekspresji przewyższał nawet wartości dla linii gorzkich z polimorfizmem typu *Iucundus*. Co ważne, poziom ekspresji pozostałych trzech genów był u genotypów z Briańska również porównywalny z poziomem obserwowanym u form gorzkich. Geny, których ekspresję analizowano, zlokalizowane są w różnych grupach sprzężeń /pseudochromosomach NLL, a porównywalne profile ekspresji uzyskano dla wszystkich trzech obiektów z Briańska. Na tej podstawie można uznać, że za niską zawartość alkaloidów odpowiada w ich przypadku inny mechanizm, niewarunkowany przez locus *iucundus*. Tym samym obiekty z Briańska są potencjalnie nowym źródłem mutacji warunkującej niską zawartość alkaloidów, a dalsza ich analiza może znacząco zwiększyć nasze zrozumienie procesu biosyntezy QA i jej regulacji u NLL. Kontynuacja prac badawczych z wykorzystaniem genotypów pochodzących z Briańska była/jest prowadzona w ramach kierowanych przeze mnie dalszych projektów badawczych tj.: NCN, MINIATURA 3, „Badania pilotażowe nowego mechanizmu regulacji niskiej zawartości alkaloidów w nasionach łubinu wąskolistnego, poprzez powiązanie poziomu ekspresji genów szlaku biosyntezy alkaloidów z akumulacją tych związków w poszczególnych organach rośliny" (2019/03/X/NZ1/02009, 21.12.2019-9.06.2021) oraz MRiRW, Postęp Biologiczny „Alkaloidy u łubinu wąskolistnego: zrozumienie molekularnych podstaw procesu biosyntezy i akumulacji w nasionach oraz poszukiwanie form o wysokiej zawartości alkaloidów w zielonych częściach rośliny, przy zachowaniu niskiej zawartości w nasionach" (nr 19, 1.01.2021-31.12.2026).

W przypadku 199 obiektów zgodność segregacji markera iuc_RAP2-7 wynosiła 100%, przy założeniu progu TAC 0,5% s.m. nasion. Mając na uwadze powyższe wyniki walidacji markera iuc_RAP2-7 w Polskiej Kolekcji *Lupinus* można uznać, że poza obiektami pochodzącymi z Briańska, zawartość alkaloidów u pozostałych 199 analizowanych genotypów pozostaje pod decydującym wpływem locus *iucundus*. Opracowany marker iuc_RAP2-7 spełnia więc kryteria stawiane markerom diagnostycznym stosowanym w MAS i może być

bezpośrednio wykorzystany w programach hodowlanych prowadzonych dla NLL, jako obiecujące narzędzie do odrzucenia materiałów wyraźnie gorzkich (≥ 0,9% s.m.), na wczesnych etapach selekcji. Obecnie, prowadzona przez hodowców selekcja genotypów o niskiej zawartości alkaloidów opiera się na oznaczeniu TAC w zebranych nasionach. Wykorzystanie markerów molekularnych zapewnia większą efektywność i skrócenie cykli prowadzonej selekcji hodowlanej, oferując czasową i finansową oszczędność. Kodominacyjna segregacja markera iuc_RAP2-7 stanowi jego dodatkowy atut, pozwalając na odróżnienie genotypów homozygotycznych od heterozygotycznych, czego nie zapewniają żadne metody oceny zawartości alkaloidów w nasionach. Wziąwszy pod uwagę silne przesłanki co do kluczowego znaczenia genu *RAP2-7* w regulacji biosyntezy alkaloidów u NLL (Kroc i in., 2019a; Garg i in., 2022), zakotwiczony bezpośrednio w jego sekwencji marker jest najprawdopodobniej markerem funkcjonalnym. W selekcji wspomaganej markerami, skutkuje to silną przewagą nad markerem bliskosprzężonym w związku z brakiem ryzyka niepożądanej rekombinacji pomiędzy markerem i genem (Yang i in., 2015).

Podsumowując, w ramach kierowanych przeze mnie badań wykazaliśmy, że opracowany marker iuc_RAP2-7 może stanowić skuteczne narzędzie ulepszające efektywność selekcji hodowlanej, a tym samym wyprowadzenie nowych, niskoalkaloidowych odmian NLL. Zastosowana procedura selekcji może więc przyczynić się do doskonalenia jakości nasion tego gatunku. Ponadto wykazaliśmy, że w Polskiej Kolekcji *Lupinus* obecne są genotypy o niewarunkowanej locus *iucundus* niskiej zawartości QA w nasionach. Dalsza analiza atypowych genotypów może się zatem przyczynić się do pełniejszego zrozumienia złożoności molekularnych mechanizmów warunkujących niską zawartość QA w nasionach NLL.

H3 Czepiel K., Krajewski P., Wilczura P., Bielecka P., Swiecicki W., **Kroc M***. (**2021**). Expression profiles of alkaloid-related genes across the organs of narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) and in response to anthracnose infection. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (5): 2676.

Kolejnym kluczowym etapem w realizacji przedłożonego osiągnięcia naukowego była analiza profili ekspresji genów zaangażowanych w akumulację QA, w kolejnych organach roślin NLL i odniesienie uzyskanych wyników do akumulacji alkaloidów w tych organach. Zestaw siedmiu genów badanych (*CCR*, *HMT/HLT*, *LaAT*, *LaCAO*, *LDC*, *RAP2-7* i *DHDPS*) obejmował zarówno geny strukturalne, jak i kandydackie w biosyntezie i akumulacji QA oraz stanowił kontynuację badań opublikowanych w roku 2019 (Kroc i in., 2019a). Głównym celem badań była weryfikacja udziału poszczególnych organów w biosyntezie QA, a dodatkowym dalsze wyjaśnienie roli genu *RAP2-7* w regulacji procesu biosyntezy tych związków u NLL. Podjęte badania były również próbą określenia roli QA w odpowiedzi obronnej rośliny skierowanej przeciwko grzybom fitopatogenicznym, na podstawie analizy profili ekspresji genów powiązanych z akumulacją alkaloidów, u roślin porażonych *Colletotrichum lupini*, wywołującym antraknozę. Wyniki uzyskane dla obu zagadnień (biosyntezy QA i określenia roli QA) omówiono poniżej w dwóch odrębnych sekcjach.

W badaniach dotyczących ekspresji genów w poszczególnych organach uwzględniono dwie odmiany NLL, tj. słodką Regent i gorzką Oskar, a uzyskane wyniki ekspresji odniesiono do oznaczonej zawartości alkaloidów w tych organach, w tym zarówno TAC, jak i procentowego udziału poszczególnych alkaloidów. Łącznie, dla każdej odmiany przeanalizowano 13 prób/organów, na różnym etapie rozwoju fenologicznego. Na etapie kwitnienia rośliny

analizowano ekspresję genów i zawartość alkaloidów w młodych liściach (oznaczone jako liść I), łodydze (głównej i bocznej), kwiatach oraz korzeniu (głównym i bocznym). Na etapie zawiązywania strąków analizy prowadzono natomiast na liściach (liść II) i młodych strąkach, a na etapie dojrzewania strąków analizowano ekspresję genów w liściach (liść III), zielonych strączynach (strąki pozbawione nasion), jak i zielonych nasionach. Ponadto zawartość alkaloidów oznaczono także w suchych strączynach i suchych nasionach.

Wieloczynnikowa analiza wariancji wykazała istotne statystycznie ($p < 0,01$) interakcje pomiędzy efektem badanego organu i odmiany, w odniesieniu do ekspresji wszystkich badanych genów, poza *DHDPS*. Identyfikacja wzorów ekspresji poszczególnych genów w badanych organach pozwoliła na wyróżnienie szeregu organo-specyficznych zależności, zarówno pomiędzy odmianami, jak i w obrębie organów każdej z odmian indywidualnie. Ekspresja większości genów była znacznie wyższa w organach odmiany gorzkiej. Co ważne, zidentyfikowano istotne statystycznie różnice (odnotowane jako krotność zmian, ang. fold change) pomiędzy poziomem ekspresji genów w poszczególnych organach odm. Oskar (gorzkiej) względem odm. Regent (słodkiej). Na tej podstawie wyróżniono cztery grupy genów. Pierwszą grupę reprezentował gen *RAP2-7*, którego ekspresja była istotnie wyższa tylko w liściach I i II u odm. Oskar. Do drugiej grupy, charakteryzującej się najwyższą krotnością zmian ekspresji w liściach, łodydze i młodych strąkach odm. Oskar, a których ekspresja nie różniła się w korzeniach, zakwalifikowano geny: *LaAT*, *LaCAO* i *LDC*. Trzeci wzór ekspresji reprezentował gen *HMT/HLT*, którego ekspresja była w większości organów porównywalna u genotypu gorzkiego i słodkiego. Gen *DHDPS*, którego ekspresja była istotnie wyższa we wszystkich organach odm. Oskar zakwalifikowano natomiast do grupy czwartej. Tym samym wykazano, że ekspresja większości badanych genów kandydackich była istotnie wyższa w organach nadziemnych odm. Oskar tj. liściach, łodydze, i młodych strąkach, a także zielonych strączynach. Poziom ekspresji większości genów w kwiatach odm. Oskar był również wyższy, niż w kwiatach odm. Regent, jednak warto zaznaczyć, iż odnotowana krotność zmian była w tym przypadku niższa. W odniesieniu do korzeni i zielonych nasion ekspresja większości badanych genów nie była wyższa u odmiany gorzkiej względem słodkiej.

Kilka kolejnych, organowo specyficznych zależności wyłoniono także na podstawie analizy porównawczej profili ekspresji w obrębie różnych organów tej samej odmiany. U odmiany gorzkiej, najwyższą ekspresję większości genów odnotowano głównie w liściach, łodydze głównej i bocznej oraz młodych strąkach (w kolejności nieco różniącej się dla poszczególnych genów). Dodatkowo stwierdzono, że ekspresja w liściach obniżała się w trakcie rozwoju i dojrzewania rośliny, a najwyższy jej poziom obserwowany był w trakcie kwitnienia (liść I). Z kolei, najniższy poziom ekspresji większości genów u odm. Oskar zaobserwowano w korzeniach i zielonych nasionach, z wyraźnym wyjątkiem odnotowanym dla genu *LDC*. Nie wykazano natomiast istotnych różnic pomiędzy poziomem ekspresji w korzeniu głównym, a bocznymi. Pomiędzy organami odm. Regent obserwowany poziom ekspresji wszystkich badanych genów był znacznie bardziej wyrównany, z wyraźnym wyjątkiem istotnie wyższej ekspresji genu *LDC* w korzeniach. Dodatkowo, porównanie specyficznych organowo wzorów ekspresji, uzyskanych dla każdej z odmian indywidualnie pozwoliło na sformułowanie dwóch ważnych spostrzeżeń. Przede wszystkim, w organach odm. Oskar wzór ekspresji *RAP2-7* i profile pozostałych genów były do siebie podobne, tj. najwyższą ekspresję odnotowano w wymienionych wyżej organach zielonych. Ekspresja genu *RAP2-7* w organach odm. Regent przypominała wynik uzyskany dla odm. Oskar, z wyraźnym wyjątkiem liści I i II, które cechowały się niższym poziomem ekspresji u odm. Regent. Drugim ważnym wynikiem jest odnotowanie w korzeniach obu odmian, znacznie wyższej ekspresji genu *LDC*, w stosunku do pozostałych genów badanych.

Dalszych informacji na temat powiązań badanych genów dostarczyła analiza korelacji ich ekspresji. W przypadku odm. Regent odnotowane współczynniki korelacji były bądź istotne ale bardzo niskie, bądź statystycznie nieistotne ($p > 0.01$). Natomiast w przypadku odmiany gorzkiej, poza genem *DHDPS*, ekspresja wszystkich badanych genów była silnie, pozytywnie skorelowana ($p < 0.01$). Najsilniejsze wzajemne korelacje wykazano dla genów *CCR*, *LaAT*, *LaCAO*, *LDC* i *RAP2-7*. Szczegółowa analiza korelacji ekspresji *LDC* (katalizującego pierwszy etap biosyntezy, tj. dekarboksylację lizyny do kadaweryny) z ekspresją pozostałych genów wykazała natomiast, że zależność ta nie zawsze ma przebieg liniowy. Sporządzenie wykresu punktowego zaobserwowanych wartości ekspresji genów QA w zależności od organu wskazało bowiem, że wyniki ekspresji odnotowane w korzeniach grupują się odrębnie względem wyników reprezentujących inne organy. Obserwacje te były najbardziej zauważalne w przypadku zależności ekspresji *LaCAO* i *LDC*. Co istotne, wyłączenie z analizy wyników ekspresji uzyskanych dla korzeni znacznie podwyższa współczynniki korelacji pomiędzy genem *LDC* i pozostałymi genami. Na tej podstawie można wnioskować, że ekspresja genu *LDC* jest inaczej regulowana w organach nadziemnych oraz w korzeniach.

Analiza zawartości alkaloidów jednoznacznie potwierdziła, że TAC w organach odm. Oskar jest istotnie wyższa niż u odm. Regent, a przy czym pomiędzy poszczególnymi organami odmiany gorzkiej również zidentyfikowano istotne różnice ($p < 0.001$). Najwyższą zawartość alkaloidów odnotowano w zielonych i suchych nasionach, młodych strąkach i kwiatach odm. Oskar. Natomiast najniższą zawartość zidentyfikowano w korzeniach i suchych strączynach tej odmiany. Pozostałe organy odm. Oskar cechowały się umiarkowaną zawartością tych związków. W przypadku odm. Regent, nie stwierdzono istotnych różnic w niskim TAC poszczególnych organów. Na podstawie przeprowadzonej analizy wariancji, wykazano także, że skład jakościowy alkaloidów w poszczególnych organach badanych odmian, nie jest uwarunkowany statystycznie istotną interakcją ($p > 0.01$) pomiędzy efektem organu rośliny i odmianą. Różnice w składzie jakościowym w poszczególnych organach nie były istotne, za wyjątkiem 13-benzoyloksylupaniny. Natomiast dla analizowanych odmian istotnie różny okazał się udział procentowy dziesięciu alkaloidów.

Podsumowując, wyniki analizy ekspresji genów związanych z akumulacją QA w poszczególnych organach odmiany słodkiej i gorzkiej NLL potwierdzają, że większość QA u tego gatunku syntezowana jest w zielonych częściach rośliny (Yang i in., 2017; Otterbach i in., 2019). Różnice wykazane w poziomie ekspresji badanych genów pomiędzy organami wskazują, że udział poszczególnych organów w biosyntezie QA jest zróżnicowany. Uzyskane wyniki stanowią jednocześnie ważny wkład w dyskusję naukową dotyczącą udziału nasion w biosyntezie QA (Lee i in., 2007) wskazując, że organy te są miejscem magazynowania alkaloidów, a ich udział w procesie biosyntezy jest znikomy.

Reanalizując wyniki działań zmierzających do pełniejszego zrozumienia udziału czynnika *RAP2-7* w regulacji biosyntezy QA, uzyskaliśmy nowe dane świadczące o istotnej złożoności tego procesu (jak i zróżnicowanej regulacji poszczególnych genów składowych). Na tle wcześniejszych wyników (Kroc i in., 2019a) potwierdziliśmy hipotezę, że ekspresja *RAP2-7* u odmiany gorzkiej jest wysoka, poza liśćmi, również w innych organach nadziemnych. Wysoki poziom ekspresji tego genu faktycznie odnotowano w liściach, łodygach i strąkach odm. Oskar, a podobne profile odnotowano także dla ekspresji kluczowych genów: *LDC*, *LaCAO*, *LaAT* i *CCR*. Wykazanie sprzężonej ekspresji dodatkowo uprawdopodabnia rolę *RAP2-7*, jako kluczowego regulatora biosyntezy QA u NLL. Interesującym wynikiem był jednak zaobserwowany podobny poziom ekspresji genu *RAP2-7* we wszystkich, poza liściem I i II, organach odm. Oskar i odm. Regent, przy jednoczesnym utrzymaniu istotnie niższego poziomu ekspresji pozostałych genów szlaku biosyntezy QA w zielonych częściach odm. Regent. Przyczyną niskiej ekspresji

większości genów QA w organach odm. Regent, w których jednocześnie odnotowano relatywnie wysoką ekspresję *RAP2-7*, mogą być zarówno zmiany wpływające na aktywność *RAP2-7* lub udział dodatkowych czynników regulatorowych. Na obecnym etapie badań uprawnia to do wniosku, że zidentyfikowana wcześniej w sekwencji *RAP2-7* niesynonimiczna substytucja seryny (allel słodki) na argininę (allel gorzki) (Kroc i in., 2019b; Kroc i in., 2019a), pełni kluczową rolę, najprawdopodobniej zaburzając budowę kodowanego białka wskutek odmiennych właściwości fizykochemicznych obu aminokwasów. W wariancie słodkim *RAP2-7*, umiejscowienie zidentyfikowanego SNP w miejscu kluczowym dla prawidłowej funkcji białka (np. w domenie AP2), może skutkować osłabieniem zdolności i/lub specyficzności wiązania czynnika transkrypcyjnego z DNA. Wpływa to tym samym na transkrypcję kolejnych genów w szlaku biosyntezy i zubożenie zawartości alkaloidów lizynowych. W celu jednoznacznego wyjaśnienia mechanizmu regulacji ekspresji przez *RAP2-7* w poszczególnych organach NLL niezbędne są jednak dalsze badania, również z uwzględnieniem większej liczby badanych genotypów.

Ciekawych wniosków dostarczyła także wspomniana już, wysoka ekspresja genu *LDC* w korzeniach zarówno u odmiany gorzkiej, jak i słodkiej. Mając na uwadze znikomy poziom ekspresji pozostałych genów QA w korzeniach, prawdopodobne jest zaangażowanie *LDC* w inne szlaki metaboliczne, np. w syntezę kadaweryny. Kadaweryna, należąca do poliamin ma udokumentowany udział na wielu etapach rozwoju rośliny, w tym regulacji wzrostu korzeni, czy rozgałęzień bocznych (Gamarnik i Frydman, 1991; Tomar i in., 2013; Jancewicz i in., 2016). Innym wyjaśnieniem wysokiej ekspresji *LDC* w korzeniach może być powiązanie syntezy kadaweryny zarówno w szlaku QA, jak i w procesie nodulacji, ponieważ poliaminy są także potencjalnymi regulatorami wymiany składników odżywczych w brodawkach korzeniowych (Whitehead i in., 2001). Wcześniejsze prace, na podstawie eksperymentu przeszczepiania z wykorzystaniem genotypu gorzkiego i słodkiego NLL wskazywały, że w biosyntezie alkaloidów mogą brać udział również korzenie (Lee i in., 2007). Mając jednak na uwadze wyniki naszych badań, możliwą interpretacją wcześniejszych rezultatów jest import kadaweryny syntezowanej w korzeniach do organów nadziemnych.

Odrębna część prezentowanej publikacji dotyczyła <u>oceny zmian ekspresji genów związanych z akumulacją QA w odpowiedzi na porażenie *C. lupini*</u>, rozpatrując przy tym dwa aspekty badawcze. Pierwszy aspekt dotyczył analizy profili ekspresji po porażeniu patogenem, z uwzględnieniem wrażliwości badanych odmian NLL tj. grupy odmian odpornych i podatnych na porażenie *C. lupini*. Drugie podejście badawcze uwzględniało analizę profili ekspresji genów QA, z uwzględnieniem zawartości alkaloidów w nasionach badanych genotypów tj. w grupie genotypów o wysokim i niskim TAC. Ekspresję genów analizowano w liściach siewek, ośmiu odmian NLL.

Analiza wyników uzyskanych dla odmian o różnej wrażliwości na porażenie *C. lupini* nie ujawniła statystycznie istotnych interakcji pomiędzy poziomem odporności na porażenie patogenem i czasem po porażeniu, na ekspresję genów zaangażowanych w akumulację QA ($p < 0.01$). Natomiast ekspresja poszczególnych genów QA, poza *RAP2-7*, była zależna od odporności na porażenie *C. lupini* i/lub punktów czasowych po infekcji. Analizując zmiany ekspresji genów QA w punktach czasowych po porażeniu wykazano, że w przypadku genotypów podatnych, ekspresja większości genów obniżała się. U genotypów odpornych ekspresja większości genów nie zmieniła się istotnie po porażeniu lub była porównywalna do obserwowanej u genotypów podatnych.

Analizując profile ekspresji u roślin porażonych *C. lupini*, z uwzględnieniem klasyfikacji genotypów na słodkie i gorzkie, wykazano istotne interakcje ($p < 0.01$) pomiędzy TAC i czasem

po infekcji, skorelowane z poziomem ekspresji czterech genów tj. *CCR*, *LaAT*, *LaCAO* i *LDC*. Ekspresja poszczególnych genów badanych, z wyjątkiem *RAP2-7*, była również zależna od badanej odmiany i/lub punktów czasowych po infekcji. Po porażeniu, w grupie odmian gorzkich wykazano istotny spadek ekspresji wszystkich genów, z wyjątkiem *DHDPS*. U genotypów słodkich ekspresja większości genów nie zmieniała się po porażeniu (*LDC*, *LaAT*, *RAP2-7* i *CCR*), a niektórych (*LaCAO*, *HMT/HLT*) spadała. Wzór ekspresji *DHDPS* był podobny w genotypach gorzkich i słodkich, tj. po nieznacznym wzroście w punkcie czasowym I, jego ekspresja powróciła do poziomu obserwowanego w kontroli.

Podsumowując, powyższe wyniki wskazują, że odpowiedź rośliny na porażenie *C. lupini* jest najprawdopodobniej niezależna od biosyntezy QA. Wykazany spadek lub brak istotnych zmian ekspresji większości badanych genów po porażeniu, niezależnie od wrażliwości genotypu na porażenie *C. lupini*, przeczy zaangażowaniu alkaloidów w aktywnym systemie obrony rośliny przed infekcją. Wynik ten ma korzystne znaczenie z punktu widzenia zastosowania nasion w żywieniu. Jednocześnie zaobserwowane po porażeniu obniżenie ekspresji genu *LDC* u genotypów podatnych, ale nie u odpornych, rodzi przypuszczenie, że to poliaminy, a nie alkaloidy mogą częściowo warunkować odporność na antraknozę u NLL. Udział poliamin w reakcjach obronnych rośliny wymaga jednak dalszego wyjaśnienia.

H4 Święcicki W., Czepiel K., Wilczura P., Barzyk P., Kaczmarek Z., **Kroc M***. (**2019**). Chromatographic fingerprinting of the Old World Lupins seed alkaloids: A supplemental tool in species discrimination. *Plants* 8 (12):548

Celem prowadzonych badań było kompleksowe scharakteryzowanie podobieństw i różnic pomiędzy gatunkami OWL na podstawie profili alkaloidów w nasionach. Podjęto również próbę oszacowania możliwości wykorzystania uzyskanych danych, jako narzędzia pomocniczego w odróżnianiu gatunków. Na tle dostępnej literatury, prezentowana praca jest najpełniejszym podsumowaniem dla gatunków OWL, uwzględniającym gatunki stosunkowo niedawno opisane tj.: *L. anatolicus*, *L. mariae-josephi* i *L.* x *hispanicoluteus*, a dla większości również szereg reprezentantów w obrębie gatunku. Analizie poddano zestaw 73 genotypów reprezentujących 10 dzikich gatunków OWL. Dla celów porównawczych w badaniach uwzględniono także trzy gatunki uprawne tj. *L. angustifolius*, *L. albus* i *L. luteus*. Z zastosowaniem chromatografii gazowej oznaczono zarówno TAC (% s.m.), jak i udział procentowy poszczególnych alkaloidów głównych (>1% s.m. nasion). Łącznie w 13 gatunkach zidentyfikowano 20 alkaloidów, spośród których 19 stanowiło alkaloidy główne, różne u poszczególnych gatunków. Alkaloidy wykrywane w nasionach OWL w większości należały do grupy QA. U niektórych gatunków obecne były natomiast także alkaloidy piperydynowe (tj. ammodendryna) i indolowe (tj. gramina).

Oszacowanie jakościowej zawartości alkaloidów w nasionach 13 gatunków OWL, pozwoliło na wyznaczenie alkaloidów głównych dla poszczególnych gatunków, których liczba wynosiła od dwóch do dziewięciu. Najczęściej występującym alkaloidem była lupinina, stanowiąca alkaloid główny dla dziewięciu gatunków (*L. anatolicus*, *L. atlanticus*, *L. cosentinii*, *L. digitatus*, *L. hispanicus* (subsp. *bicolor* i subsp. *hispanicus*), *L. hispanicoluteus*, *L. luteus*, *L. palaestinus*, *L. pilosus*). Następnie, zidentyfikowano alkaloidy o największym udziale procentowym w TAC badanych gatunków OWL, którymi były lupinina, multifloryna i lupanina. Uzyskane wyniki pokazały także, że zaobserwowane różnice w proporcjach tych trzech alkaloidów, pozwalają na wyróżnienie czterech grup gatunków OWL (na podstawie wartości średnich dla gatunku, grupy opisane poniżej). Ponadto, w wielu przypadkach możliwe było

dalsze rozróżnienie gatunków w obrębie danej grupy, na podstawie specyficznych dla gatunku, pozostałych alkaloidów głównych.

W pierwszej z czterech wyróżnionych grup gatunków OWL, alkaloidem głównym, o największym udziale procentowym była lupanina. W grupie tej znalazły się trzy gatunki tj. *L. angustifolius*, *L. albus* i *L. mariae-josephi*. Poza wyróżniającym się udziałem lupaniny, grupę tą cechował brak lupininy. Dla *L. albus* i *L. angustifolius* zidentyfikowano dwa inne alkaloidy wspólne tj. 13-hydroksylupaninę i angustifolinę. Natomiast, spośród cech charakterystycznych dla poszczególnych gatunków wyróżnić należy obecność albiny, ammodenryny i multiforyny u *L. albus* oraz obecność izolupaniny w *L. angustifolius*. W składzie jakościowym *L. mariae-josephi*, dominowała lupanina, a pozostałe alkaloidy główne stanowiły jej pochodne.

Cechą wyróżniającą drugą grupę był największy udział procentowy lupininy w TAC nasion. Trzy, przynależne do grupy taksony (*L. luteus*, oba podgatunki *L. hispanicus* i *L.* × *hispanicoluteus*) cechował ponadto brak multifloryny i lupaniny. Kilka dodatkowych cech charakterystycznych uznano jako pomocne w dalszym rozróżnieniu gatunków z tej grupy. W przypadku *L. luteus* charakterystycznymi alkaloidami głównymi były sparteina i ammodendryna, przy czym zawartość sparteiny w tym gatunku była najwyższa spośród wszystkich OWL. W obu podgatunkach *L. hispanicus* przeważała lupinina (ok. 97%). Więcej trudności przysparza odróżnienie trzeciego gatunku tj. *L.* × *hispanicoluteus*, co wynika z różnej kombinacji alleli rodzicielskich w poszczególnych liniach mieszańca międzygatunkowego i warunkuje duże zróżnicowanie składu jakościowego alkaloidów w nasionach.

Grupę trzecią utworzyło sześć gatunków (*L. atlanticus*, *L. anatolicus*, *L. cosentinii*, *L. digitatus*, *L. palaestinus*, *L. pilosus*), o największym udziale procentowym dwóch alkaloidów tj. lupininy i multifloryny, cechujące się także brakiem lupaniny, jako alkaloidu głównego. Analizując dalej proporcje lupininy i multifloryny zidentyfikowano następnie *L. atlanticus* cechujący się wyższym udziałem procentowym lupininy nad multifloryną (proporcja obu alkaloidów 2:1). Co ciekawe, w gatunku tym poza pochodnymi multifloryny nie zidentyfikowano dodatkowych alkaloidów głównych. Pozostałe pięć gatunków utworzyło podgrupę o większym udziale procentowym multifloryny niż lupininy, w której skład jakościowy pozostałych alkaloidów głównych pozwalał na wyszczególnienie elementów charakterystycznych dla poszczególnych gatunków tej podgrupy.

Do ostatniej grupy zaliczono jeden gatunek tj. *L. micranthus*. Cechą wyróżniającą *L. micranthus* był dominujący udział procentowy multifloryny (i jej pochodnych).

Warto zaznaczyć iż uzyskanie spójnych wyników dotyczących udziału procentowego alkaloidów głównych, dla prób nasion danego gatunku pochodzących z różnych banków genów/środowisk, stanowi dodatkową, ważną przesłankę na korzyść możliwości rozróżniania gatunków OWL na podstawie jakościowego składu alkaloidów w ich nasionach. Dodatkowo, podparciem uzyskanych wyników były również przeprowadzone na podstawie jakościowego składu alkaloidów analizy PCA, które wyodrębniały trzy gatunki, tj. *L. albus*, *L. angustifolius* i *L. mariae-josephi*, o profilach wyraźnie różniących się od pozostałych OWL (największy udział procentowy lupaniny), a także wykazały grupowanie się gatunków o największym udziale procentowym lupininy i multifloryny.

Większość alkaloidów oznaczanych w nasionach OWL należała do grupy QA. Podgrupy OWL wyróżnione na podstawie jakościowego składu alkaloidów, w zestawieniu z przypuszczalnym szlakiem biosyntezy QA wskazują, że kluczowym etapem biosyntezy jest przekształcenie piperydyny, do poszczególnych alkaloidów głównych poprzez intermediat (zasadę Schiffa). Proces ten prowadzi do powstawania dwupierścieniowej lupininy, czteropierścieniowej lupaniny, multifloryny, czy sparteiny, albo też kombinacji tych

alkaloidów. Pozostałe QA formowane są raczej w dalszych etapach szlaku biosyntezy. Ciekawa jest również zaobserwowana zależność, że dla gatunków, których lupinina była alkaloidem głównym, nie była nim lupanina. Konwersja prowadząca do formowania się sparteiny wydaje się mniej powszechna w gatunkach OWL, a sama sparteina stanowiła alkaloid główny tylko u kilku gatunków. W dalszych badaniach zmierzających do rozwikłania szlaku biosyntezy alkaloidów kluczowe wydaje się zrozumienie podstaw przemian prowadzących do czterech wymienionych alkaloidów głównych, zarówno w kontekście mechanizmu jak i jego regulacji.

W drugiej części pracy analizie poddano TAC oznaczony w nasionach badanych gatunków. Mając na uwadze, że zawartość alkaloidów w nasionach, poza komponentem genetycznym, jest warunkowana również środowiskowo, zasadnicze analizy statystyczne dotyczące TAC prowadzono dla genotypów pochodzących z jednego doświadczenia polowego (gatunki pochodzące z Polskiej Kolekcji *Lupinus*, tj. 10 gatunków, 49 genotypów). Celem prowadzonych analiz było oszacowanie zmienności wewnątrzgatunkowej oraz zmienności międzygatunkowej w obrębie OWL. Co istotne, w obrębie większości gatunków uwzględnionych w analizach statystycznych wykazano istotne różnice, co wskazuje, że TAC nie jest wartością stałą dla gatunku. Wynik ten został dalej podparty wykazaniem istotnych różnic w TAC u przedstawicieli tego samego gatunku, których nasiona otrzymano z różnych banków genów, co potwierdziło silny wpływ środowiska na badaną cechę. Uzyskane rezultaty świadczą więc że, w przeciwieństwie do składu jakościowego alkaloidów głównych, TAC nie jest wiarygodnym parametrem pozwalającym na rozróżnianie gatunków OWL.

Niezależnie od wyników zmienności wewnątrzgatunkowej, w pracy podjęto również próbę oszacowania różnic międzygatunkowych na podstawie TAC nasion. Wykazano, że badane gatunki różnią się istotnie pod względem TAC w nasionach ($F_{calc.} = 53.75 > F_{0.01} = 2.63$), a w toku dalszych analiz statystycznych badane OWL przyporządkowano do trzech grup jednorodnych. Do pierwszej grupy, o najwyższej średniej zawartości alkaloidów, zaliczono *L. mariae-josephi*. Odrębność tego gatunku została potwierdzona zarówno na poziomie analiz biochemicznych, jak i filogenetycznych, nie pozwalając na jego jednoznaczne przypisanie ani do grupy gładko-, ani szorstkonasiennych (Aïnouche i in., 2004; Mahé i in., 2011). Grupa druga obejmowała gatunki o umiarkowanej zawartości alkaloidów, a trzecia o niskiej zwartości tych związków. Gatunki przypisane do grupy drugiej i trzeciej odpowiadają klasycznemu podziałowi na gatunki gładko- i szorstko nasienne. Niespodziewanym rezultatem było natomiast odnotowanie wyższej średniej zawartości alkaloidów w grupie drugiej, zawierającej gatunek *L. hispanicus* (drugorzędowa pula genowa dla gatunku uprawnego *L. luteus*) i *L.× hispanicoluteus*, w stosunku do grupy trzeciej, obejmującej dzikie gatunki szorstkonasienne.

Podsumowując, wyniki przedstawionej pracy niezaprzeczalnie dostarczają wiedzy na temat alkaloidów jako związków fitochemicznych w gatunkach OWL i przyczyniają się do lepszego poznania podobieństw i różnic pomiędzy poszczególnymi gatunkami. Jednocześnie, wykazane wzory jakościowego składu alkaloidów mogą być użyteczne jako narzędzie wspomagające w rozróżnianiu gatunków OWL. Niemiarodajne okazało się natomiast rozróżnianie gatunków na podstawie TAC, ze względu na zarówno istotną zmienność wewnątrzgatunkową, jak i wpływ środowiska na obserwowaną zawartość alkaloidów w nasionach. Analiza profili alkaloidów w nasionach OWL stanowi kolejny krok w ewaluacji zasobów genetycznych dla łubinów prowadzonych w Zakładzie Genomiki Roślin Strączkowych (Kamel i in., 2016; Kroc i in., 2017), tym samym przyczyniając się do lepszego zrozumienia obserwowanej zmienności, jak i całościowo procesu akumulacji tych związków u łubinów.

4.3.3. Podsumowanie osiągnięcia naukowego

Przedstawiony cykl prac prezentuje osiągnięcie naukowe, które dostarcza istotnych danych przybliżających nas do zrozumienia molekularnego mechanizmu leżącego u podstawy biosyntezy i akumulacji alkaloidów u łubinu wąskolistnego oraz poszerza wiedzę na temat zmienności profili alkaloidowych u gatunków OWL. W przedstawionym cyklu publikacji za najważniejsze dokonania uważam:

1) Scharakteryzowanie transkryptomów linii łubinu wąskolistnego o sposobie regulacji biosyntezy alkaloidów warunkowanym allelami *iucundus* i *Iucundus*, które pozwoliło na wytypowanie genów kandydackich dla biosyntezy i akumulacji QA u tego gatunku.

2) Zidentyfikowanie czynnika transkrypcyjnego *RAP2-7* (AP2/ERF) jako genu kandydackiego dla locus *iucundus*, pełniącego kluczową rolę w regulacji akumulacji QA u łubinu wąskolistnego (Kroc i in., 2019b; Garg i in., 2022).

3) Identyfikację kluczowej mutacji S196R w sekwencji *RAP2-7* jako charakterystycznej dla allela *iucundus*, a także opracowanie i zwalidowanie markera molekularnego iuc_RAP2_7, jako użytecznego narzędzia w hodowli, do selekcji materiałów łubinu wąskolistnego pod kątem zawartości alkaloidów w nasionach.

4) Zidentyfikowanie w Polskiej Kolekcji *Lupinus* obiektów o niskiej zawartości alkaloidów w nasionach, niewarunkowanej locus *iucundus* (linie pochodzące z Briańska), stanowiących cenny materiał badawczy dla dalszego poznawania mechanizmu akumulacji QA.

5) Potwierdzenie roli organów nadziemnych w biosyntezie QA oraz nikłego w nim udziału nasion, a także dalsze rozpoznanie roli *RAP2-7* w regulacji akumulacji QA, wyznaczające dalsze kierunki prac badawczych.

6) Pozyskanie wstępnych wyników świadczących, że QA najprawdopodobniej nie uczestniczą bezpośrednio w reakcji odpornościowej rośliny na porażenie grzybem fitopatogenicznym *C. lupini* oraz wskazanie możliwości udziału w tym procesie poliamin, których prekursorem jest L-lizyna.

7) Scharakteryzowanie profili alkaloidów w nasionach gatunków OWL, co stanowi kolejny etap waloryzacji zasobów genetycznych łubinów. Wykazanie możliwej przydatności składu procentowego alkaloidów głównych jako narzędzia wspomagającego identyfikację gatunkową.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

Aktywność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora (do 2010r.)

Moje zainteresowanie łubinem zapoczątkowała realizacja pracy doktorskiej, którą podjęłam w 2004 r. w Pracowni Analizy Genomu, Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu, pod kierunkiem prof. dr hab. Wojciecha Święcickiego, czł. rzecz. PAN, zostając jednocześnie

słuchaczką studium doktoranckiego na Wydziale Biologii, Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu.

Główna część badań pracy doktorskiej została zrealizowana w ramach 6. Programu Ramowego Unii Europejskiej, Grain Legumes Integrated Project (Akronim: GLIP), ”New strategies to improve grain legumes for food and feed” (FP6-2002-FOOD-1-506223, Koordynator prof. N. Ellis, John Innes Centre, UK). Prowadzoną tematykę badawczą poszerzał również projekt badawczy promotorski Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Nr N N310 090536), kierowany przez prof. dr hab. Wojciecha Święcickiego, w którym byłam jedynym wykonawcą.

Celem badań było ustalenie stopnia konserwatywności genomu NLL, w stosunku do genomów czterech innych gatunków z rodziny Fabaceae o różnym stopniu pokrewieństwa filogenetycznego (*Medicago truncatula*, *Lotus japonicus*, *Phaseolus vulgaris* oraz *Arachis* (genom A)). Na podstawie uzyskanych rezultatów wykazałam, że syntenia genomu NLL i pozostałych badanych gatunków jest w pewnym stopniu zachowana, ale dotyczy krótkich bloków konserwatywnych, co odzwierciedla znaczny dystans filogenetyczny łubinów, które oddzieliły się od pozostałych gatunków Fabaceae bardzo wcześnie w toku ewolucji (Lavin i in., 2005). Drugim celem realizowanej pracy doktorskiej była identyfikacja rejonów genomu NLL warunkujących plon i elementy jego struktury, a także zawartość alkaloidów w nasionach. Pozwoliło to na wstępną identyfikację powtarzalnych w latach QTL, kontrolujących elementy struktury plonu. Ponadto, na podstawie jednorocznych wyników zawartości QA wstępnie zidentyfikowałam QTL warunkujące zawartość tych związków w nasionach, w tym region L.ang_LG7 ówczesnej wersji mapy genetycznej obejmujący locus *iucundus*. Pracę doktorską pt. "Lokalizacja markerów zdefiniowanych sekwencyjnie i loci cech ilościowych oraz mapowanie porównawcze genomu łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.)", obroniłam w dniu 13 lipca 2010 roku (wyróżnienie rozprawy doktorskiej, nadane uchwałą Rady Naukowej IGR PAN).

Podczas realizacji pracy doktorskiej i międzynarodowego projektu UE GLIP współpracowałam z naukowcami z licznych ośrodków naukowych. Dzięki współpracy z grupą australijską, w tym głównie Dr. Jeffrey Boersma i Dr Huuan Yang (Department of Agriculture and Food Western Australia, Perth) oraz Dr. Matthew Nelson (wtedy: University of Western Australia, Perth) uzyskałam dostęp zarówno do populacji mapującej RIL (83A:476 x P27255; nasiona otrzymane w ramach umowy o współpracy pomiędzy State of Western Australia i IGR PAN), jak i danych źródłowych kolejnych wersji mapy genetycznej (tj. opublikowanej przez Boersma i in. (2005), Nelson i in. (2006), a także Nelson i in. (2010), której jestem jednocześnie współautorką). Mapa genetyczna była początkowo moim podstawowym narzędziem lokalizacji genów/markerów genetycznych w genomie NLL. Ponadto, aktywny udział w corocznych spotkaniach z partnerami projektu GLIP, umożliwił mi prezentację uzyskanych wyników, jak i dyskusje związane z mapowaniem porównawczym genomów roślin strączkowych. W celu zwiększenia efektywności generowania markerów zdefiniowanych sekwencyjnie (ang. Sequence Tagged Site, STS) dla NLL odbyłam kilka **zagranicznych staży naukowych** (**wymienione poniżej**), które pozwoliły mi opanować różne techniki generowania markerów molekularnych (*Cel*I, CAPS/dCAPS, SnaPShot) i przyczyniły się do uzyskania efektywnych wyników w projekcie GLIP. Szczególnie staż odbyty w Murdoch University przyczynił się dodatkowo do umocnienia mojej współpracy z grupami australijskimi (Murdoch University, University of Western Australia), której wynikiem jest trwająca do dziś **współpraca naukowa i wspólne publikacje** (**wymienione poniżej**).

Staże naukowe (finansowane w ramach projektu UE, GLIP):

- 15 listopada – 27 grudnia 2007 (**czasu trwania stażu: 1,5 miesiąca**)

Miejsce pobytu: Murdoch University, The Australian Centre for Necrotrophic Fungal Pathogenes, Perth, Australia; Kierownik: prof. Richard Oliver
Cel: staż szkoleniowy, zastosowanie metody genotypowania SnaPshot, mapowanie porównawcze i analiza syntenii w obrębie gatunków bobowatych.

- 13 września – 13 grudnia 2006 (**czasu trwania stażu: 3 miesiące**)

Miejsce: Montana State University, Plant Sciences and Plant Pathology Department, Bozeman, USA; Kierownik: prof. Norman F. Weeden
Cel: staż szkoleniowy, testowanie starterów opracowanych dla rośliny modelowej w populacji mapującej NLL oraz w kolekcji łubinów Starego Świata.

- 26 – 30 czerwiec 2006 (**czasu trwania stażu: 1 tydzień**)

Miejsce: University of Aarhus, Laboratory of Gene Expression, Aarhus, Dania; Kierownik: prof. Jens Stougaard
Cel: staż szkoleniowy, mapowanie porównawcze w obrębie gatunków bobowatych, zastosowanie programu komputerowego PriFi do projektowania starterów amplifikujących sekwencje konserwatywne; projektowanie markerów CAPS i dCAPS.

- 5 – 9 lipiec 2004 (**czasu trwania stażu: 1 tydzień**)

Miejsce: Biological Research Center of Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Węgry; Kierownik: Dr. György B. Kiss
Cel: staż szkoleniowy, zastosowanie enzymu *Cel*I w wykrywaniu polimorfizmu pojedynczego nukleotydu.

Publikacje:

Wyniki pracy doktorskiej związane z opracowaniem markerów STS zostały włączone do publikacji mającej na celu analizę syntenii NLL i *Lotus japonicus* powstałej w ramach współpracy z grupą australijską:

Nelson M.N., Moolhuijzen P.M., Boersma J.G., **Chudy M***., Lesniewska K., Bellgard M., Oliver R.P., Swiecicki W., Wolko B., Cowling W.A., Elwood S.R. (2010). Aligning a new reference genetic map of *Lupinus angustifolius* with the genome sequence of the model legume, *Lotus japonicus*. DNA Research 17: 73-83; DOI: 10.1093/dnares/dsq001. IF 4,754; MEiN 140.

*****nazwisko panieńskie habilitantki

Aktywność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora (po 2010r.)

Mapowanie genetyczne łubinu wąskolistnego - kontynuacja zainteresowań dotyczących badania syntenii genomu NLL i pokrewnych Fabaceae.

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam prace związane ze wzbogacaniem mapy genetycznej NLL markerami typu STS, w celu mapowania porównawczego i analizy syntenii genomu NLL z gatunkami pokrewnymi. Kontynuując współpracę z Dr. M. Nelson (wcześniej: University of Western Australia, Perth, Australia, a obecnie: Commonwealth Scientific and

Industrial Research Organisation (CSIRO), Floreat, Australia) podjęliśmy się oszacowania stopnia konserwatywności genomów NLL i gatunku modelowego dla bobowatych tj. *M. truncatula*. Zastosowanie puli 394 loci wspólnych dla obu genomów znacznie poszerzyło obraz obserwowanej syntenii i kolinearności pomiędzy badanymi genomami, w stosunku do wcześniej dostępnych doniesień (Nelson i in., 2006). Przede wszystkim jednak, na podstawie uzyskanych wyników po raz pierwszy wskazano przykłady duplikacji i/lub tryplikacji dużych regionów chromosomów w genomie NLL. Uzyskane wyniki świadczą o jednej lub większej liczbie zdarzeń duplikacji/ tryplikacji genomu NLL, po oddzieleniu się od pozostałych Faboideae. W połączeniu z zaobserwowanymi licznymi rearanżacjami w genomie, uzyskane dane wskazywały na dawny przebieg tych procesów, a tym samym potwierdzały paleoploidalne pochodzenie gatunku NLL.

Uzyskane wyniki zostały **opublikowane jako**:

Kroc M., Koczyk G., Święcicki W., Kilian A., Nelson M. (2014). New evidence of ancestral polyploidy in the Genistoid legume *Lupinus angustifolius* L. (narrow-leafed lupin). Theoretical and Applied Genetics, 127(5):1237-1249; DOI: 10.1007/s00122-014-2294-y. IF 3,790; MEiN 100.

Badanie struktury genomu łubinu białego (*Lupinus albus* L.) i molekularnego podłoża niskiej zawartości alkaloidów u tego gatunku – nowe zainteresowanie badawcze.

Doświadczenie badawcze, w tym realizacja kierowanego przeze mnie zadania w Wieloletnim Programie Rządowym (Zadanie 2.2 „Identyfikacja genów warunkujących zawartość alkaloidów oraz zawiązywanie i utrzymywanie organów generatywnych u łubinów"; 2016-2020) pozwoliły mi na poszerzenie badań związanych z charakterystyką molekularnego podłoża biosyntezy alkaloidów u kolejnego gatunku łubinu – łubinu białego. W ramach kontynuacji współpracy z Dr. M. Nelson i nawiązania współpracy z grupą badawczą kierowaną przez Dr. B. Peret (BPMP, Université de Montpellier, CNRS, INRAE, Institut Agro, Francja) prowadziliśmy działania mające na celu analizę struktury genomu łubinu białego, jak i badanie molekularnego podłoża niskiej zawartość alkaloidów u tego gatunku. **Współpraca ta zaowocowała opublikowaniem** w 2021 roku pangenomu łubinu białego:

Hufnagel B., Soriano A., Taylor J., Divol F., **Kroc M.**, Sanders H., Yeheyis L., Nelson M., Peret B. (2021). Pangenome of white lupin provides insights into the diversity of the species. *Plant Biotechnology Journal* 19: 2532-2543; DOI 10.1111/pbi.13678. IF 13,263; MEiN 140.

Pangenom opracowano w oparciu o sekwencje genomowe uzyskane dla 39 obiektów łubinu białego, reprezentujących zarówno genotypy dzikie, odmiany lokalne (ang. landraces) oraz odmiany uprawne. Opracowany pangenom posłużył do oszacowania zmienności wewnątrzgatunkowej łubinu białego, zarówno przez identyfikację polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphisms, SNPs), jak i obecności lub braku konkretnych genów kodujących białka (ang. presence and absence variants, PAVs). Pozwoliło to na wytypowanie puli tzw. genów rdzeniowych (ang. core genes) oraz puli tzw. genów zmiennych (ang. variable genes), reprezentujących potencjalnie cenną pulę genów w pracach hodowlanych, w ulepszaniu walorów użytkowych gatunku. Uzyskane dane zostały w dalszej kolejności wykorzystane do prześledzenia, w jaki sposób proces udomowienia gatunku ukształtował obserwowaną dla gatunku zmienność, ze szczególnym uwzględnieniem zawartość alkaloidów w nasionach. Pozwoliło to na identyfikację genów kandydackich

biosyntezy alkaloidów u łubinu białego, które w dużej mierze lokalizowały się w rejonach QTL, ale także w innych rejonach genomu, wskazując na konieczność kontynuacji badań, dla pełnego zrozumienia tego procesu.

Dalsze prace badawcze mające na celu poznanie molekularnych i biochemicznych mechanizmów biosyntezy i akumulacji alkaloidów u łubinu białego prowadzę zarówno we współpracy z wyżej wymienionymi naukowcami, jak i grupą badaczy z Uniwersytetu w Kopenhadze, kierowaną przez Dr. Fernando Geu-Flores. W ramach współpracy, mgr K. Czepiel, w przewodzie doktorskim której pełnię rolę promotora pomocniczego, odbyła krótkoterminową wizytę naukową, w celu weryfikacji roli potencjalnych genów kandydackich w biosyntezie alkaloidów u łubinu białego, z zastosowaniem techniki wyciszania genów indukowanego infekcją wirusową (ang. Virus-Induced Gene Silencing, VIGS). Na obecnym etapie trwa przygotowanie manuskryptu publikacji.

Udział w konsorcjum i realizacja projektu INCREASE, EU H2020.

Obecnie realizuję projekt UE w programie Horyzont 2020 „Intelligent Collections of Food Legumes Genetic Resources for European Agrofood Systems" (nr 862862, Akronim: INCREASE, czas trwania 1 maja 2020 - 30 kwietnia 2026, Koordynator: R. Papa (Universita Politecnica delle Marche, Włochy). W projekcie tym pełnię rolę współprowadzącej badania nad łubinem (K. Susek i M. Kroc: lupin crop co-leaders), który jest jednym z czterech przedstawicieli bobowatych, badanych w projekcie. Głównym celem badań prowadzonych dla łubinu jest charakterystyka zasobów genetycznych dostępnych w światowych bankach genów, dla dwóch gatunków o dużym znaczeniu dla żywienia człowieka tj. łubinu białego i łubinu andyjskiego. W tym celu pozyskaliśmy łącznie ponad 2000 obiektów dla obu gatunków, dla których wyprowadzone zostają tzw. „inteligentne kolekcje" tworzone przez dobrze scharakteryzowane (fenotypowo i molekularnie) linie czyste (wyprowadzone metodą SSD). Finalnie pozwoli to na lepsze poznanie obu gatunków, ze szczególnym uwzględnieniem wykorzystania łubinów w żywieniu człowieka. W trakcie realizacji projektu współpracuję z wieloma partnerami projektu. Na poziomie realizacji zadań prowadzonych dla łubinów aktywnie współpracuję z partnerami zaangażowanymi w analizy fenotypowe i genotypowanie (prace koordynowane przez Dr. Elena Bitocchi, UNIVPM, Włochy, liderka zadania badawczego nr 3 (ang. workpackage 3, WP3) „Sampling core collections, SSD development, DNA extraction and seed distribution"). Dodatkowo, w pracach zmierzających do scharakteryzowania kolekcji łubinów pod kątem metabolomicznym (włączając analizę alkaloidów) współpracuję z Dr. Saleh Alseekh, Max Planck Institute, Niemcy. Współpracuję także z partnerami projektu specjalizującymi się w hodowli łubinu i uczestniczącymi w rozmnożeniu wyprowadzonych linii czystych oraz doświadczeniach polowych, które planowane są dla łubinów w kolejnych latach trwania projektu (Dr. Vladimir Meglič i Dr. Barbara Pipan, Kmetijski inštitut Slovenije, Słowenia oraz Sofia Ghitarrini, ISEA, Włochy). Na poziomie organizacyjnym projektu INCREASE jako członkini Komitetu Sterującego (ang. Steering Committee), uczestniczę w dyskusjach dotyczących bieżących postępów badan naukowych i formułowaniu przyszłych planów związanych z realizacją całego projektu.

Do tej pory wynikiem realizacji projektu INCREASE są **publikacje**:

Bellucci E., Aguilar O.M., Alseekh S., Bett K., Brezeanu C., Cook D., de la Rosa L., Delledonne M., Dostatny D.F., Ferreira J.J., Geffroy V., Ghitarrini S., **Kroc M.**, Agrawal S.K., Logozzo G., Marino M., Mary-Huard T., McClean P., Meglic V., Messer T., Muel F., Nanni L., Neumann K.,

Servalli F., Strajeru S., Varshney R.K., Vasconcelos M.W., Zaccardelli M., Zavarzin A., Bitocchi E., Frontoni E., Fernie A.R., Gioia T., Graner A., Guasch L., Prochnow L., Oppermann M., Susek K., Tenaillon M., Papa R. (2021). The INCREASE project: Intelligent Collections of food-legume genetic resources for European agrofood systems; *The Plant Journal* 108: 646-660; DOI 10.1111/tpj.15472. IF 7,091; MEiN 140.

Kroc M., Tomaszewska M., Czepiel K., Bitocchi E., Oppermann M., Neumann K., Guasch L., Bellucci E., Alseekh S., Graner A., Fernie A.R., Papa R., Susek K. (2021). INCREASE - Intelligent Collections: towards development, maintenance and standardised phenotypic characterisation of single-seed-descent genetic resources for lupins. *Current Protocols* 1(7):e191; DOI: 10.1002/cpz1.191. MEiN 20.

Współpraca krajowa w zakresie lepszego zrozumienia biosyntezy i akumulacji alkaloidów oraz waloryzacji zasobów genetycznych łubinów.

Badania związane z mechanizmami biosyntezy alkaloidów prowadzę wielotorowo, współpracując z naukowcami w krajowych ośrodkach badawczych tj. z Zakładu Biometrii i Bioinformatyki IGR PAN, Zakładu Biologii Molekularnej i Systemowej, Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN oraz Zakładu Genetyki Medycznej, Uniwersytetu Warszawskiego. Efekty publikacyjne prowadzonej współpracy zostały przestawione w ramach osiągnięcia naukowego (**Publikacje: H1, H2, H3, H4**).

Ponadto, od wielu lat współpracuję z Poznańską Hodowlą Roślin (PHR) Sp. z o.o. w Tulcach, oddział Wiatrowo, która poza działalnością hodowlaną jest jednocześnie Kuratorem Polskiej Kolekcji *Lupinus.* Współpraca z PHR w Wiatrowie dotyczy zarówno uzyskiwania materiału do badań chromatograficznych i molekularnych łubinów, jak i konsultacji w zakresie potrzeb hodowli, uprawy łubinów oraz uzyskiwanych wyników badań laboratoryjnych. Tym samym współpraca ta stwarza szanse bezpośredniego poznania potrzeb tzw. praktyki, a jednocześnie wdrożenia wyników badań. Analiza zawartości alkaloidów w 367 genotypach łubinu białego, pochodzących z Polskiej Kolekcji *Lupinus*, pozwoliła na oszacowanie zmienności w ilościowym i jakościowym składzie alkaloidów u tego gatunku. Wyniki pracy zostały **opublikowane jako:**

Kroc M., Rybiński W., Wilczura P., Kamel K., Kaczmarek Z., Barzyk P., Święcicki W. (2017). Quantitative and qualitative analysis of alkaloids composition in the seeds of a white lupin (*Lupinus albus* L.) collection. Genetic Resources and Crop Evolution 64(8):1853-1860; DOI: 10.1007/s10722-016-0473-1; IF 1,130; MEiN 70.

Dodatkowo, w toku bieżących prac badawczych przeanalizowaliśmy także zawartość alkaloidów w nasionach 292 obiektów łubinu żółtego Polskiej Kolekcji *Lupinus*, a obecnie finalizujemy przygotowanie manuskryptu publikacji. Prace te, w powiązaniu z przedstawionymi w ramach osiągniecia naukowego wynikami dla wszystkich gatunków OWL (Publikacja H4), jak i wynikami wcześniejszych prac Zakładu Genomiki Roślin Strączkowych, dotyczących zawartości alkaloidów w kolekcji NLL (Kamel i in., 2016), będą stanowiły podwaliny kolejnych publikacji, zapełniając istniejącą lukę w waloryzacji zasobów genetycznych łubinów i zwiększając tym samym wartość dostępnych zasobów w programach hodowlanych.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

6.1. Działalność dydaktyczna

Prowadzenie zajęć:

Szkolenie dla uczestników Międzynarodowych Studiów Doktoranckiego IGR PAN:

- Wykłady (3h) i zajęcia praktyczne (1h) pt. „Cytogenomics" (dr hab. K. Susek, dr M. Kroc)
  - 9 i 23 listopada 2021

Szkolenie dla studentów Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z Wydziału Biologii, kierunku *Biologia roślin użytkowych*:

- Wykład i ćwiczenia pt. „Główne gatunki strączkowe uprawiane w Polsce – groch i łubin (dr M. Kroc, dr M. Gawłowska).
  - 6 i 13 maja 2014
  - 9 - 10 maja 2016
  - 24 maja 2017
- Wykład pt. „Łubiny uprawiane w Polsce. Charakterystyka gatunków i specyfika związków antyżywieniowych gromadzonych w ich nasionach" (dr M. Kroc).
  - 8 czerwca 2022

Opieka nad studentami i promotorstwo:

Funkcja promotora pomocniczego otwartych przewodów doktorskich:

- mgr Katarzyna Czepiel; Tytuł pracy doktorskiej: Molekularne podstawy syntezy alkaloidów chinolizydynowych w trzech gatunkach uprawnych łubinów: łubinie wąskolistnym (*L. angustifolius*), łubinie białym (*L. albus*) i łubinie żółtym (*L. luteus*); Uchwała nr 5/K/2021 Rady Naukowej IGR PAN, z dnia 15 września 2021 r., w sprawie wyznaczenia promotora oraz promotora pomocniczego pracy doktorskiej mgr Katarzyny Czepiel.

Opieka merytoryczna nad stażystami:

- **2022** I r. studiów 2. stopnia, UAM w Poznaniu, Wydział Biologii, Biologia, 336h („UNIWERSYTET JUTRA – zintegrowany program rozwoju Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu" nr POWR.03.05.00-00-Z303/17) – **1 osoba**.

- **2020** II r. studiów 2. stopnia, UP w Poznaniu, Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii, 360h (*Studiujesz? Praktykuj! Program staży zawodowych dla studentów Wydziału Rolnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, POWR.03.01.00-00-S126/17*) – **2 osoby**.

- **2019** II r. studiów 2. stopnia, UAM w Poznaniu, Wydział Biologii, Biotechnologia, 504h (*„Bądź konkurencyjny na rynku pracy - wysokiej jakości programy stażowe dla studentów Wydziału Biologii UAM w Poznaniu" nr POWR.03.01.00-00-S145/17*) – **1 osoba**.

- **2018** III r. studiów 1. Stopnia, UP w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, 160h (*„Studiujesz - praktykuj. Program stażowy dla studentów Wydziału Rolnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu"(UDA-POWR.03.01.00-00-S237/15*) – **1 osoba**.

- **2018** III r. studiów 1. Stopnia, UAM w Poznaniu, Wydział Biologii, Biotechnologia, 504h (*„Bądź konkurencyjny na rynku pracy - wysokiej jakości programy stażowe dla studentów Wydziału Biologii UAM w Poznaniu" nr POWR.03.01.00-00-S145/17*) – **1 osoba**.

- **2017** III r. studiów 1. Stopnia, UP w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, 160h (*„Studiujesz - praktykuj. Program stażowy dla studentów Wydziału Rolnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu"(UDA-POWR.03.01.00-00-S237/15*) – **2 osoby**.

- **2017** III r. studiów 1. Stopnia, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, 160h (*staż zawodowy*) – **1 osoba**.

6.2. Działalność organizacyjna

Udział w pracach komitetów organizacyjnych konferencji międzynarodowych:

- 3rd International Legume Society Conference, ILS3 "Legumes for Human and Planet Health", 21-24 maja 2019, Poznań.

- 13th International Lupin Conference "Lupin crops – an opportunity for today, a promise for the future", 6-9 czerwca 2011, Poznań.

Organizacja Seminariów Naukowych IGR PAN

- **2019 – obecnie**
  współorganizacja i prowadzenie seminariów naukowych IGR PAN

Rada Młodych Pracowników Naukowych IGR PAN

- **2013 – 2019**
  w tym Przewodnicząca Rady Młodych Pracowników Naukowych IGR PAN (2016-2019)

Rada Naukowa IGR PAN

- **2018**
  przedstawicielka pracowników naukowych adiunktów i asystentów IGR PAN.

Grupa Robocza ds. wyróżnienia HR Excellence in Research

- **2016-2019**
  udział w pracach Grupy Roboczej ds. wyróżnienia HR Excellence in Research powołanej przez Dyrektora IGR PAN (wyróżnienie przyznane IGR PAN w 2014 r).

6.3. Działalność popularyzująca naukę

- **24.04.2017**
  XX Festiwal Nauki i Sztuki, IChB Poznań „IGRaszki z roślinami", udział w przygotowaniu warsztatów dla dzieci i prowadzenie zajęć.

- **14.01.2014**
  Noc Biologów, IGR PAN, Poznań „Tajemnicze substancje występujące w roślinach", udział w przygotowaniu warsztatów dla dzieci i prowadzenie zajęć.

7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej

Realizowane projekty badawcze

W trakcie mojej pracy zawodowej uczestniczyłam w realizacji łącznie **13 naukowych projektów badawczych** (lista projektów w Zał. 4). Po uzyskaniu stopnia doktora uczestniczyłam/uczestniczę w realizacji dziewięciu projektów krajowych i jednego projektu europejskiego. Po uzyskaniu stopnia doktora kierowałam zadaniami badawczym w Wieloletnich Programach Rządowych realizowanych w latach 2011-2015 (Uchwała RM 149/2011) i 2016-2020 (Uchwała RM nr 222/2015). Rządowe Programy Wieloletnie są uchwalane przez Radę Ministrów RP dla badań o szczególnym znaczeniu dla gospodarki. W moim przypadku dotyczyły one możliwości dywersyfikacji zapatrzenia strategicznego surowca dla produkcji żywności tj. białka paszowego. Celem Programu było zapewnienie bezpieczeństwa białkowego kraju oraz oszczędność importu soi na poziomie 2-3 mld złotych rocznie. O ich znaczeniu świadczy monitorowanie wyników przez Komisję Rolnictwa Sejmu RP. Ponadto, po uzyskaniu stopnia doktora kierowałam również działaniem naukowym NCN, MINIATURA 3 (nr 2019/03/X/NZ1/02009), realizowanym w okresie 2019-2021. Obecnie jestem kierownikiem projektu MRiRW (Postęp Biologiczny, nr 19, Dzienniku Ustaw RP z dnia 16.11.2020 r.), realizowanego w latach 2020-2027. Finansowane przez MRiRW badania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej dotyczą tematyki ważnej dla hodowli roślin uprawnych. Ponadto, w ramach projektu UE Horyzont 2020 (nr 862862), przyznanym na lata 2020-2026, współkieruję obecnie badaniami dotyczącymi łubinu (lupin crop co-leader) oraz jestem członkinią Komitetu Sterującego Projektu. Dodatkowo, uczestniczę w Europejskim Programie COST Action, EPI-CATCH (CA19125, WG3), wspierającym współpracę naukową.

Podsumowanie dorobku naukowego

Jestem współautorką 27 publikacji, spośród których 10 zostało opublikowanych w czasopismach indeksowanych w bazie JCR (w tym 9 po uzyskaniu stopnia doktora). Sumaryczny Impact Factor wszystkich publikacji wynosi 47,942 (zgodnie z rokiem opublikowania), a liczba punktów MEiN wynosi 1270 (wg komunikatu Ministra Edukacji i Nauki z 21.12.2021 r.). Według bazy Web of Science moje publikacje były cytowane 200 razy (128 wyłączając autocytowania, stan na dzień 11.09.2022), a mój indeks Hirsha wynosi 6. Jestem również współautorką rozdziału w monografii wydanej przez wydawnictwo Springer oraz trzech artykułów w kwartalniku „Legume Perspectives" wydawanym przez International Legume Society (ILS). Ponadto, po uzyskaniu stopnia doktora na konferencjach naukowych wygłosiłam sześć referatów oraz zaprezentowałam osiem plakatów (łączny dorobek naukowy po doktoracie obejmuje 9 referatów konferencyjnych i 24 plakaty).

Otrzymane nagrody i wyróżnienia

- Wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Członkostwo w międzynarodowych towarzystwach naukowych

- **2016 – obecnie**

International Legume Society (ILS)

Szkolenia

Dzięki licznym szkoleniom poszerzałam wiedzę i doskonaliłam swój warsztat naukowy. Były to między innymi:

- **28 – 30 czerwca 2021**

Plant Epigenetics: Basics, Applications and Methodologies. EpiCATCH COST action training school, online.

- **12 grudnia 2015**

Functional annotation of genome sequences. BIO-TALENT workshop, UAM, Poznań.

- **21- 22 października 2013**

Microsoft Excel 2010 – zaawansowana obsługa arkusza kalkulacyjnego. IT School s.c., Poznań.

- **28-29 czerwca 2012**

Real-time PCR w oznaczeniach jakościowych i ilościowych. Centrum Edukacji Medycznej CEMED Sp. z o.o., Uniwersytet Medyczny, Poznań.

- **17 maja 2012**

Interdyscyplinarne warsztaty komunikacji naukowej. Fundacja UAM i Poznański Park Naukowo- Technologiczny, Poznań.

- **22-24 marca 2012**

Genomika funkcjonalna i proteomika. MBS Serwis dla Biologii Molekularnej, Warszawa.

- **18 listopada 2011**

Projektowanie starterów i sond do Real-Time PCR. Centrum Badań DNA, Park Naukowo - Technologiczny, Poznań.

- **10 – 11 lutego 2011**

Real-time PCR w badaniach hodowli komórkowych. Centrum Edukacji Medycznej CEMED Sp. z o.o., Uniwersytet Medyczny, Poznań.

- **28 maja – 1 czerwca 2007**

Workshop on Scientific Communication. IGR PAN, Poznań.

PODPIS ZAUFANY
MAGDALENA KATARZYNA
KROC
10.10.2022 15:25:54 [GMT+2]
Dokument podpisany elektronicznie podpisem zaufanym

…….
(podpis wnioskodawcy)

Literatura:

Aïnouche A., Bayer R.J., Misset M.T. (2004). Molecular phylogeny, diversification and character evolution in *Lupinus* (Fabaceae) with special attention to Mediterranean and African lupines. Plant Systematics and Evolution 246 (3-4): 211-222.

Aukerman M.J., Sakai H. (2003). Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2-Like Target Genes. Plant Cell 15 (11): 2730-2741.

Boschin G., Arnoldi A. (2011). Legumes are valuable sources of tocopherols. Food Chemistry 127 (3): 1199-203.

Bunsupa S., Okada T., Saito K., Yamazaki M. (2011). An acyltransferase-like gene obtained by differential gene expression profiles of quinolizidine alkaloid-producing and nonproducing cultivars of *Lupinus angustifolius*. Plant Biotechnology 28 (1): 89-94.

Bunsupa S., Yamazaki M., Saito K. (2012a). Quinolizidine alkaloid biosynthesis: recent advances and future prospects. Frontiers in Plant Science 3: 239.

Bunsupa S., Katayama K., Ikeura E., Oikawa A., Toyooka K., Saito K., Yamazaki M. (2012b). Lysine decarboxylase catalyzes the first step of quinolizidine alkaloid biosynthesis and coevolved with alkaloid production in leguminosae. Plant Cell 24 (3): 1202-16.

Cardenas P.D., Sonawane P.D., Pollier J., Vanden Bossche R., Dewangan V., Weithorn E., Tal L., Meir S., Rogachev I., Malitsky S., Giri A.P., Goossens A., Burdman S., Aharoni A. (2016). GAME9 regulates the biosynthesis of steroidal alkaloids and upstream isoprenoids in the plant mevalonate pathway. Nature Communications 7: 10654.

Chen X. (2004). A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. Science 303 (5666): 2022-5.

Cowling W.A., Buirchell B.J., Tapia M.E. (red.) (1998). Lupin. *Lupinus* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 23. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Rome, Italy. 105 s.

Czepiel K., Krajewski P., Wilczura P., Bielecka P., Święcicki W., Kroc M. (2021). Expression Profiles of Alkaloid-Related Genes across the Organs of Narrow-Leafed Lupin (Lupinus angustifolius L.) and in Response to Anthracnose Infection. International Journal of Molecular Sciences 22 (5): 2676.

Facchini P.J., St-Pierre B. (2005). Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic enzymes. Current Opinion in Plant Biology 8 (6): 657-66.

Fontanari G.G., Batistuti J.P., Cruz R.J.D., Saldiva P.H.N., Arêas J.G. (2012). Cholesterol-lowering effect of whole lupin (Lupinus albus) seed and its protein isolate. Food Chemistry 132 (3): 1521-1526.

Frick K.M., Foley R.C., Kamphuis L.G., Siddique K.H.M., Garg G., Singh K.B. (2018). Characterization of the genetic factors affecting quinolizidine alkaloid biosynthesis and its response to abiotic stress in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.). Plant, Cell & Environment 23 (10): 13172.

Gamarnik A., Frydman R.B. (1991). Cadaverine, an Essential Diamine for the Normal Root Development of Germinating Soybean (Glycine max) Seeds. Plant Physiology 97 (2): 778-785.

Garg G., Kamphuis L.G., Bayer P.E., Kaur P., Dudchenko O., Taylor C.M., Frick K.M., Foley R.C., Gao L.-L., Aiden E.L., Edwards D., Singh K.B. (2022). A pan-genome and chromosome-length reference genome of narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius*) reveals genomic diversity and insights into key industry and biological traits. The Plant Journal 111: 1252-1266.

Gladstones J.S. (1998) Distribution, origin, taxonomy, history and importance. W: Lupins as crop plants: biology, production, and utilization. GLADSTONES J. S., ATKINS C. A., HAMBLIN J. (red.). CAB International: 1-36.

Hane J.K., Ming Y., Kamphuis L.G., Nelson M.N., Garg G., Atkins C.A., Bayer P.E., Bravo A., Bringans S., Cannon S., Edwards D., Foley R., Gao L.-L., Harrison M.J., Huang W., Hurgobin B., Li S., Liu C.-W., Mcgrath A., Morahan G., Murray J., Weller J., Jian J., Singh K.B. (2017). A comprehensive draft genome sequence for lupin (*Lupinus angustifolius*), an emerging health food: insights into plant–microbe interactions and legume evolution. Plant Biotechnology Journal 15 (3): 318-330.

Hirai M.Y., Suzuki H., Yamazaki M., Saito K. (2000). Biochemical and partial molecular characterization of bitter and sweet forms of *Lupinus angustifolius*, an experimental model for study of molecular

regulation of quinolizidine alkaloid biosynthesis. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 48 (10): 1458-61.

Itkin M., Heinig U., Tzfadia O., Bhide A.J., Shinde B., Cardenas P.D., Bocobza S.E., Unger T., Malitsky S., Finkers R., Tikunov Y., Bovy A., Chikate Y., Singh P., Rogachev I., Beekwilder J., Giri A.P., Aharoni A. (2013). Biosynthesis of antinutritional alkaloids in solanaceous crops is mediated by clustered genes. Science 341 (6142): 175-9.

Jancewicz A.L., Gibbs N.M., Masson P.H. (2016). Cadaverine's Functional Role in Plant Development and Environmental Response. Frontiers in Plant Science 7: 870.

Kage U., Kumar A., Dhokane D., Karre S., Kushalappa A.C. (2016). Functional molecular markers for crop improvement. Critical Reviews in Biotechnology 36 (5): 917-30.

Kamel K.A., Święcicki W., Kaczmarek Z., Barzyk P. (2016). Quantitative and qualitative content of alkaloids in seeds of a narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) collection. Genetic Resources and Crop Evolution 63 (4): 711-719.

Kamphuis L.G., Garg G., Foley R., Singh K.B. (2021). Genomic resources for lupins are coming of age. Legume Science 3 (3): e77.

Kroc M., Koczyk G., Święcicki W., Kilian A., Nelson M. (2014). New evidence of ancestral polyploidy in the Genistoid legume *Lupinus angustifolius* L. (narrow-leafed lupin). Theoretical and Applied Genetics 127 (5): 1237-1249.

Kroc M., Rybiński W., Wilczura P., Kamel K., Kaczmarek Z., Barzyk P., Święcicki W. (2017). Quantitative and qualitative analysis of alkaloids composition in the seeds of a white lupin (*Lupinus albus* L.) collection. Genetic Resources and Crop Evolution 64 (8): 1853-1860.

Kroc M., Koczyk G., Kamel K.A., Czepiel K., Fedorowicz-Strońska O., Krajewski P., Kosińska J., Podkowiński J., Wilczura P., Święcicki W. (2019a). Transcriptome-derived investigation of biosynthesis of quinolizidine alkaloids in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) highlights candidate genes linked to *iucundus* locus. Scientific Reports 9 (1): 2231.

Kroc M., Czepiel K., Wilczura P., Mokrzycka M., Święcicki W. (2019b). Development and Validation of a Gene-Targeted dCAPS Marker for Marker-Assisted Selection of Low-Alkaloid Content in Seeds of Narrow-Leafed Lupin (*Lupinus angustifolius* L.). Genes 10 (6): 428.

Lavin M., Herendeen P.S., Wojciechowski M.F. (2005). Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary. Systematic Biology 54 (4): 575-594.

Lee M.J., Pate J.S., Harris D.J., Atkins C.A. (2007). Synthesis, transport and accumulation of quinolizidine alkaloids in *Lupinus albus* L. and *L. angustifolius* L. Journal of Experimental Botany 58 (5): 935-946.

Li X., Yang H., Buirchell B., Yan G. (2011). Development of a DNA marker tightly linked to low-alkaloid gene *iucundus* in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) for marker-assisted selection. Crop and Pasture Science 62 (3): 218-224.

Li Y., Smolke C.D. (2016). Engineering biosynthesis of the anticancer alkaloid noscapine in yeast. Nature Communications 7: 12137.

Mahé F., Pascual H., Coriton O., Huteau V., Navarro Perris A., Misset M.-T., Aïnouche A. (2011). New data and phylogenetic placement of the enigmatic Old World lupin: *Lupinus mariae-josephi* H. Pascual. Genetic Resources and Crop Evolution 58 (1): 101-114.

Mathieu J., Yant L.J., Mürdter F., Küttner F., Schmid M. (2009). Repression of Flowering by the miR172 Target SMZ. PLoS Biology 7 (7): e1000148.

Nakano T., Suzuki K., Fujimura T., Shinshi H. (2006). Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and Rice. Plant Physiology 140 (2): 411.

Neff M.M., Neff J.D., Chory J., Pepper A.E. (1998). dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. The Plant Journal 14 (3): 387-92.

Nelson M.N., Phan H.T., Ellwood S.R., Moolhuijzen P.M., Hane J., Williams A., O'lone C.E., Fosu-Nyarko J., Scobie M., Cakir M., Jones M.G., Bellgard M., Ksiazkiewicz M., Wolko B., Barker S.J., Oliver R.P., Cowling W.A. (2006). The first gene-based map of *Lupinus angustifolius* L.-location of domestication genes and conserved synteny with *Medicago truncatula*. Theoretical and Applied Genetics 113 (2): 225-38.

Nelson M.N., Moolhuijzen P.M., Boersma J.G., Chudy M., Lesniewska K., Bellgard M., Oliver R.P., Święcicki W., Wolko B., Cowling W.A., Ellwood S.R. (2010). Aligning a New Reference Genetic Map of Lupinus angustifolius with the Genome Sequence of the Model Legume, Lotus japonicus. DNA Research 17 (2): 73-83.

Okada T., Hirai M.Y., Suzuki H., Yamazaki M., Saito K. (2005). Molecular characterization of a novel quinolizidine alkaloid o-tigloyltransferase: cDNA cloning, catalytic activity of recombinant protein and expression analysis in *Lupinus* plants. Plant & Cell Physiology 46 (1): 233-244.

Otterbach S.L., Yang T., Kato L., Janfelt C., Geu-Flores F. (2019). Quinolizidine alkaloids are transported to seeds of bitter narrow-leafed lupin. Journal of Experimental Botany 70 (20): 5799-5808.

Pascual H. (2004). *Lupinus mariae-josephi* (Fabaceae), nueva y sopredente especie descubierta en Espana [*Lupinus mariae-josephi* (Fabaceae), new and surprising species discovered in Spain]. Anales del Jardin Botanica de Madrid 61: 69-72.

Roy N.N., Gladstones J.S. (1988). Further studies with interspecific hybridization among mediterranean/African lupin species. Theoretical and Applied Genetics 75 (4): 606-609.

Rybiński W., Święcicki W., Bocianowski J., Börner A., Starzycka-Korbas E., Starzycki M. (2018). Variability of fat content and fatty acids profiles in seeds of a Polish white lupin (*Lupinus albus* L.) collection. Genetic Resources and Crop Evolution 65 (2): 417-431.

Saito K., Koike Y., Suzuki H., Murakoshi I. (1993). Biogenetic implication of lupin alkaloid biosynthesis in bitter and sweet forms of *Lupinus luteus* and *L. albus*. Phytochemistry 34 (4): 1041-1044.

Sbihi H.M., Nehdi I.A., Tan C.P., Al-Resayes S.I. (2013). Bitter and sweet lupin (Lupinus albus L.) seeds and seed oils: A comparison study of their compositions and physicochemical properties. Industrial Crops and Products 49: 573-579.

Schafer H., Wink M. (2009). Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. Biotechnology Journal 4 (12): 1684-703.

Shoji T., Kajikawa M., Hashimoto T. (2010). Clustered transcription factor genes regulate nicotine biosynthesis in tobacco. Plant Cell 22 (10): 3390-3409.

Suzuki H., Murakoshi I., Saito K. (1994). A novel O-tigloyltransferase for alkaloid biosynthesis in plants. Purification, characterization, and distribution in *Lupinus* plants. Journal of Biological Chemistry 269 (22): 15853-60.

Święcicki W., Święcicki W.K. (1995). Domestication and breeding improvement of narrow-leafed lupin (*L. angustifolius* L.). Journal of Applied Genetics 36 (2): 155-167.

Święcicki W., Święcicki W.K., Wolko B. (1996). *Lupinus anatolicus* - a new lupin species of the Old World. Genetic Resources and Crop Evolution 43 (2): 109-117.

Święcicki W., Święcicki W.K., Nijaki T. (1999). *Lupinus* x*hispanicoluteus* – an interspecific hybrid of Old World lupins. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 68 (3): 217-220.

Święcicki W., Czepiel K., Wilczura P., Barzyk P., Kaczmarek Z., Kroc M. (2019). Chromatographic Fingerprinting of the Old World Lupins Seed Alkaloids: A Supplemental Tool in Species Discrimination. Plants 8 (12): 548.

Thagun C., Imanishi S., Kudo T., Nakabayashi R., Ohyama K., Mori T., Kawamoto K., Nakamura Y., Katayama M., Nonaka S., Matsukura C., Yano K., Ezura H., Saito K., Hashimoto T., Shoji T. (2016). Jasmonate-responsive ERF transcription factors regulate steroidal glycoalkaloid biosynthesis in tomato. Plant & Cell Physiology 57 (5): 961-975.

Tomar P.C., Lakra N., Mishra S.N. (2013). Cadaverine. Plant Signaling & Behavior 8 (10): e25850.

Udomsom N., Rai A., Suzuki H., Okuyama J., Imai R., Mori T., Nakabayashi R., Saito K., Yamazaki M. (2016). Function of AP2/ERF transcription factors involved in the regulation of specialized metabolism in *Ophiorrhiza pumila* revealed by transcriptomics and metabolomics. Frontiers in Plant Science 7: 1861.

Van Der Fits L., Memelink J. (2000). ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. Science 289 (5477): 295-7.

Varshney R.K., Kudapa H., Pazhamala L., Chitikineni A., Thudi M., Bohra A., Gaur P.M., Janila P., Fikre A., Kimurto P., Ellis N. (2015). Translational Genomics in Agriculture: Some Examples in Grain Legumes. Critical Reviews in Plant Sciences 34 (1-3): 169-194.

Whitehead L.F., Tyerman S.D., Day D.A. (2001). Polyamines as potential regulators of nutrient exchange across the peribacteroid membrane in soybean root nodules. Functional Plant Biology 28 (7): 677-683.

Wink M. (1988). Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. Theoretical and Applied Genetics 75 (2): 225-233.

Wink M., Meißner C., Witte L. (1995). Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. Phytochemistry 38 (1): 139-153.

Winzer T., Gazda V., He Z., Kaminski F., Kern M., Larson T.R., Li Y., Meade F., Teodor R., Vaistij F.E., Walker C., Bowser T.A., Graham I.A. (2012). A *Papaver somniferum* 10-gene cluster for synthesis of the anticancer alkaloid noscapine. Science 336 (6089): 1704-1708.

Yang H., Jian J., Li X., Renshaw D., Clements J., Sweetingham M.W., Tan C., Li C. (2015). Application of whole genome re-sequencing data in the development of diagnostic DNA markers tightly linked to a disease-resistance locus for marker-assisted selection in lupin (*Lupinus angustifolius*). BMC Genomics 16 (1): 1-17.

Yang T., Nagy I., Mancinotti D., Otterbach S.L., Andersen T.B., Motawia M.S., Asp T., Geu-Flores F. (2017). Transcript profiling of a bitter variety of narrow-leafed lupin to discover alkaloid biosynthetic genes. Journal of Experimental Botany 68 (20): 5527-5537.