Załącznik 2a

Instytut Genetyki Roślin
Polskiej Akademii Nauk
Strzeszyńska 34
60-479 Poznań

AUTOREFERAT

Identyfikacja regionów bogatych w geny w genomie łubinu wąskolistnego wykazujących wysoki stopień kolinearności w obrębie rodziny roślin bobowatych oraz określenie wpływu duplikacji całych genomów na proces ewolucji wybranych genów zlokalizowanych w tych regionach

Dr Michał Książkiewicz
Zespół Struktury i Funkcji Genów
Zakład Genomiki

Poznań, 26 kwietnia 2019

Michał Książkiewicz

1. Imię i Nazwisko

Michał Książkiewicz

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

Doktor nauk rolniczych, dyscyplina – agronomia (14.12.2010 r.); Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Rozprawa doktorska pt.: „Struktura i organizacja regionów genomu warunkujących odporność na grzyby patogeniczne u łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.)" wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Bogdana Wolko.

Magister biotechnologii (17.06.2004); Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Praca magisterska pt.: „Analiza komputerowa obrazu tkanki kalusowej *Salsola pestifer* (A. Nelson) z pustyni Kyzył-Kum rosnącej in vitro w warunkach stresu solnego" wykonana pod kierunkiem dr Barbary Stefaniak w Zakładzie Botaniki Ogólnej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Licencjat biotechnologii (04.07.2002); Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

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

01.01.2011-obecnie - adiunkt w Pracowni Genomiki Strukturalnej (od 2013 r. pod nazwą Zespół Struktury i Funkcji Genów, Zakład Genomiki) Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

01.10.2009-31.12.2010 - specjalista biotechnolog, w Pracowni Genomiki Strukturalnej Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

01.10.2007-30.09.2009 - stypendysta Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, doktorant w Pracowni Genomiki Strukturalnej Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, uczestnik Studium Doktoranckiego przy Wydziale Biologii UAM w Poznaniu

01.10.2004-30.09.2007 - stypendysta Prezesa Polskiej Akademii Nauk, doktorant w Pracowni Genomiki Strukturalnej Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, uczestnik Studium Doktoranckiego przy Wydziale Biologii UAM w Poznaniu

01.07.2004-30.09.2004 - biotechnolog – stażysta w Pracowni Genomiki Strukturalnej Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm.):

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

„Identyfikacja regionów bogatych w geny w genomie łubinu wąskolistnego wykazujących wysoki stopień kolinearności w obrębie rodziny roślin bobowatych oraz określenie wpływu duplikacji całych genomów na proces ewolucji wybranych genów zlokalizowanych w tych regionach."

4.2. Publikacje składające się na osiągnięcie (autorzy, rok wydania, tytuły publikacji, czasopismo):

- **Książkiewicz M.**[a], Wyrwa K., Szczepaniak A., Rychel S., Majcherkiewicz K., Przysiecka Ł., Karlowski W., Wolko B., Naganowska B. (2013). Comparative genomics of *Lupinus angustifolius* gene-rich regions: BAC library exploration, genetic mapping and cytogenetics. BMC Genomics 14:79. **[IF_{2013}: 4.500[c], $MNiSW_{2016}$[d]: 40 pkt, liczba cytowań[e]: 14]**

- **Książkiewicz M.**[a], Zieleziński A., Wyrwa K., Szczepaniak A., Rychel S., Karłowski W., Wolko B., Naganowska B. (2015). Remnants of the legume ancestral genome preserved in gene-rich regions: insights from *Lupinus angustifolius* physical, genetic, and comparative mapping. Plant Molecular Biology Reporter 33: 84-101. **[IF_{2015}: 1.995, $MNiSW_{2016}$: 40 pkt, liczba cytowań: 9]**

- Przysiecka Ł., **Książkiewicz M.**[a], Wolko B., Naganowska B. (2015) Structure, expression profile and phylogenetic inference of chalcone isomerase-like genes from the narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) genome. Frontiers in Plant Science 6:268. **[IF_{2015}: 4.461, $MNiSW_{2016}$: 40 pkt, liczba cytowań: 11]**

- **Książkiewicz M.**[a], Rychel S., Nelson M.N., Wyrwa K., Naganowska B., Wolko B. (2016). Expansion of the phosphatidylethanolamine binding protein family in legumes: a case study of *Lupinus angustifolius* L. *FLOWERING LOCUS T* homologs, *LanFTc1* and *LanFTc2*. BMC Genomics 17:820. [**IF_{2016}: 4.284, $MNiSW_{2016}$: 40 pkt, liczba cytowań: 7]**

- Narożna D.[b], **Książkiewicz M.**[a,b], Przysiecka Ł., Króliczak J., Wolko B., Naganowska B., Mądrzak C. (2017). Legume isoflavone synthase genes have evolved by whole-genome and local duplications yielding transcriptionally active paralogs. Plant Science 264: 149-167. **[IF_{2017}: 3.802, $MNiSW_{2016}$: 35 pkt, liczba cytowań: 1]**

- Szczepaniak A., **Książkiewicz M.**[a], Podkowiński J., Czyż K.B., Figlerowicz M., Naganowska B. (2018). Legume cytosolic and plastid acetyl-coenzyme–A carboxylase genes differ by evolutionary patterns and selection pressure schemes acting before and after whole-genome duplications. Genes 9:563. **[IF_{2017}: 3.286, $MNiSW_{2016}$: 25 pkt, liczba cytowwań: 0]**

a – autor korespondencyjny
b – autorzy o równorzędnym udziale oznaczonym w pracy
c – wartość współczynnika wpływu Impact Factor (IF) wg bazy Journal Citation Reports (JCR) Clarivate Analytics dla prac opublikowanych przed 2018 rokiem podano zgodnie z rokiem ich opublikowania; w przypadku prac opublikowanych w latach 2018-2019 podano najnowszy dostępny IF opublikowany w roku 2018
d – punktację MNiSW dla poszczególnych publikacji podano wg wykazu z 2016 roku
e – liczbę cytowań podano wg bazy Web of Science Core Collection Clarivate Analytics na dzień 26 kwietnia 2019 roku

Opis indywidualnego wkładu habilitanta w powstanie każdej z wieloautorskich publikacji przedstawiono w Załączniku nr 3a (Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki). Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych publikacji, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, przedłożono w Załączniku nr 4.

4.3. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania. Pogrubioną czcionką wyróżniono publikacje, w których habilitant jest jednym z autorów oraz inne formy upublicznienia wyników badań (np. numery akcesyjne sekwencji zdeponowanych w bazach danych).

4.3.1. Wprowadzenie

Bobowate (*Fabaceae* Lindl., *Papilionaceae* Giseke) pod względem liczby gatunków są trzecią co do wielkości rodziną roślin telomowych, a w kontekście znaczenia agronomicznego ustępują jedynie rodzinie wiechlinowatych (*Poaceae* (R. Br.) Barnh., *Gramineae* Juss.), do której należą m.in. zboża. Bobowate są podstawowym źródłem białka roślinnego w żywieniu ludzi i drugim co do znaczenia rezerwuarem produkcji oleju roślinnego (Graham and Vance 2003). Bobowate są także cenionym składnikiem systemów uprawy roli opartych na płodozmianie, zarówno w rolnictwie konwencjonalnym jak i ekologicznym, ze względu na wzbogacanie ziemi w przyswajalne dla innych roślin związki azotowe produkowane w procesie symbiozy diazotroficznej (Anglade et al. 2015). Łubin wąskolistny (*Lupinus angustifolius* L.) jest przedstawicielem rodzaju *Lupinus*, który w obrębie rodziny bobowatych jest klasyfikowany do podrodziny *Faboidae* (*Papilionoideae*) i plemienia Genisteae (Lewis et al. 2005). Liczba gatunków roślin należących do rodzaju *Lupinus* wciąż nie została jednoznacznie ustalona. Wcześniejsze oszacowania zakładały, że jest to 500-600 gatunków, autorzy późniejszych prac zawęzili tę liczbę do około 275-280 gatunków (Hughes and Eastwood 2006). Łubiny posiadają zalety roślin bobowatych, a ich uprawa poprawia strukturę gleby i zwiększa plonowanie roślin następczych (Peoples et al. 2009).

Łubiny były wykorzystywane przez człowieka już w czasach starożytnej Grecji i Rzymu, ale zasadniczemu procesowi udomowienia zostały poddane dopiero w ubiegłym wieku. Najbardziej udoskonalony został łubin wąskolistny, u którego w toku prac hodowlanych, prowadzonych niezależnie w wielu ośrodkach w Europie, Australii i Ameryce Północnej, zlokalizowano szereg cech o korzystnych znaczeniu agronomicznym, zaś metodami genetyki klasycznej określono typ dziedziczenia genów kandydujących i ewentualne sprzężenie z genami innymi cech. Zdefiniowano w ten sposób loci dla niepękania strąków (*tardus* i *lentus*) (Gladstones 1967), niskiej zawartości alkaloidów (*iucundus*, *esculentus* i *depressus*) (Hackbarth and Troll 1956; von Sengbusch 1942), przepuszczalności okrywy nasiennej (*mollis*) (Forbes and Wells 1968; Mikolajczyk 1966), wczesności kwitnienia (*Ku* i *Julius*) (Gladstones and Hill 1969), białego koloru kwiatów (*leucospermus*) oraz odporności na choroby wywoływane przez grzyby patogeniczne - antraknozę (*Lanr1*, *AnMan*, *LanrBo*) (Fischer et al. 2015; Yang et al. 2004; Yang et al. 2008a) i brunatną plamistość łodyg (*PhtjR*, *Phr1*, *Phr2*) (Shankar et al. 2002; Yang et al. 2013a). Zaawansowanie prac hodowlanych doprowadziło do wyselekcjonowania materiałów o wysokim stopniu homozygotyczności, zawierających skumulowane geny co najmniej kilku cech użytkowych. Materiały te posłużyły w następnej kolejności do utworzenia populacji mapujących tego gatunku (Boersma et al. 2005; Yang et al. 2013b) oraz bibliotek klonów BAC zawierających DNA genomu jądrowego (Gao et al. 2011; Kasprzak et al. 2006), które otworzyły nowe możliwości badawcze. Łubin wąskolistny, jako gatunek o pochodzeniu paleopoliploidalnym, relatywnie niewielkiej liczbie chromosomów (2n=40) i umiarkowanej wielkości genomu (2C=1.89) (Kaczmarek et al. 2009; Naganowska et al. 2003), został uznany za takson referencyjny dla rodzaju *Lupinus*, a w konsekwencji także dla całego kladu genistoids.

Badania molekularne genomu łubinu wąskolistnego zostały zainicjowane na początku lat 90 i doprowadziły do utworzenia pierwszych map genetycznych zawierających głównie markery polimorfizmu losowo powielonych fragmentów DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD), które jednak miały ograniczone zastosowanie w badaniach ze względu na brak powtarzalności analiz prowadzonych w różnych ośrodkach badawczych (Kruszka and Wolko 1999; Wolko 1995). Opracowywane w badaniach molekularnych nowe metody generowania markerów DNA były sukcesywnie wdrażane do prac z zakresu genomiki strukturalnej łubinu wąskolistnego, jak chociażby

polimorfizm długości fragmentów amplifikowanych (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, AFLP). Utworzona w ten sposób została kolejna, bogato wysycona markerami mapa genetyczna łubinu wąskolistnego, ale mało użyteczna do dalszych analiz, albowiem napotkano znaczne trudności przy próbach sekwencjonowania tych markerów (Brien et al. 1999). Odkrycie istnienia polimorfizmu loci mikrosatelitarnych stanowiło przyczynek do modyfikacji metody AFLP w tzw. polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów mikrosatelitarnych (*Microsatellite-anchored Fragment Length Polymorphism*, MFLP) (Yang et al. 2001) (Yang et al. 2001). Metoda MFLP pozwoliła na wygenerowanie kilkuset polimorficznych markerów i utworzenie mapy genetycznej na matrycy DNA australijskiej populacji mapującej uzyskanej z krzyżowania linii hodowlanej, 83A:476, zawierającej pary alleli udomowionych genów *tardus*, *lentus*, *mollis*, *lecuspermus*, *iucundus*, *Ku* i *Lanr1* oraz linii dzikiej, P27255, zawierającej pary alleli dzikich tych genów (Boersma et al. 2005). Populacja ta została przekazana również Instytutowi Genetyki Roślin PAN w Poznaniu w celu umożliwienia równoległego prowadzenia badań w ramach współpracy naukowej (dr Hua'an Yang z Department of Agriculture and Food, Western Australia). Ponieważ pozyskanie sekwencji prążków MFLP okazało się relatywnie mało skomplikowane, metoda ta posłużyła do wygenerowania szeregu markerów na cechy użytkowe łubinu wąskolistnego, które zostały wdrożone do australijskich programów hodowlanych. Były to m.in. markery na *Ku* (KuHM1) (Boersma et al. 2007b), *iucundus* (iucLi) (Li et al. 2011), *mollis* (MoA, MoLi) (Boersma et al. 2007a; Li et al. 2012a), *tardus* (TaLi, TaM1, TaM2) (Boersma et al. 2009; Li et al. 2010) i *lentus*, LeM1, LeM2, LeLi) (Boersma et al. 2007c; Li et al. 2012b), *Lanr1* (AntjM1, AntjM2) (Yang et al. 2004; You et al. 2005), *AnMan* (AnManM1) (Yang et al. 2008a), *PhtjR* (PhtjM1, PhtjM2) i *Phr1* (Ph258M1, Ph258M2) (Yang et al. 2002). Wstępne prace prowadzone w ramach pracy doktorskiej habilitanta wykazały, że wybrane markery typu MFLP po hybrydyzacji z biblioteką BAC genomu jądrowego łubinu wąskolistnego generują specyficzne sygnały hybrydyzacyjne, ale w znacznie większej liczbie niż to wynika z prostego iloczynu liczby sond i krotności pokrycia sekwencji genomu w bibliotece **(Książkiewicz et al. 2008; Wolko et al. 2008)**. Sekwencjonowanie końców klonów BAC wskazywało na obecność sekwencji kodujących w wyselekcjonowanych klonach. Dalsze prace prowadzone przez habilitanta doprowadziły do uzyskania markerów genetycznych zakotwiczonych w sekwencjach końców wybranych klonów BAC **(Wolko et al. 2010)**.

Pierwsze doniesienia literaturowe z analizy sekwencji DNA roślin bobowatych - lucerny (*Medicago truncatula*) i komonicy (*Lotus japonicus*) - ujawniły preferencyjną lokalizację sekwencji SSR (poza powtórzeniami typu AT/TA) w regionach bogatych w geny (Mun et al. 2006; Sato et al. 2008) i wskazały na zasadność wyszukiwania takich regionów przy pomocy tego typu sekwencji. W ramach współpracy międzynarodowej w trakcie doktoratu habilitant uzyskał dostęp do markerów SSR z genomu *M. truncatula*, które następnie użył do analizy linii rodzicielskich populacji mapującej łubinu wąskolistnego, 83A:476 i P27255. Część z tych sekwencji była polimorficzna i pozwoliła na opracowanie markerów molekularnych **(Wolko et al. 2005).** Markery te zostały włączone do pierwszej mapy genetycznej łubinu wąskolistnego zawierającej loci zakotwiczone w sekwencjach genów **(Nelson et al. 2006)**, przy czym niektóre z nich znalazły się w regionach wykazujących wysoki stopień kolinearności do kontigów z genomu *M. truncatula*, który był w owym czasie we wstępnej fazie sekwencjonowania. Było to szczególnie interesujące odkrycie, bowiem łubiny oddzieliły się od głównego pnia ewolucyjnego bobowatych stosunkowo wcześnie, około 50-55 mln lat temu. Pierwsze analizy porównawcze na skalę genomową obejmujące rośliny bobowate wykazały istnienie bloków kolinearnych pomiędzy mapami genetycznymi *M. truncatula* i *M. sativa*, a także między mapami genetycznymi soi (*Glycine max*), *M. truncatula*, a sekwencją genomu rośliny modelowej, *Arabidopsis thaliana* (Choi et al. 2004; Mudge et al. 2005). Istnienie takich bloków wykorzystano do transferu informacji między gatunkami, co pozwoliło m.in. na klonowanie pozycyjne genu związanego z symbiozą u *L. japonicus*, *LjSym2* (Stracke et al. 2004), genów zdeterminowania wzrostu i regulacji fotoperiodycznej u fasoli (*Phaseolus vulgaris*) (Kwak et al. 2008), opisanego przez Grzegorza Mendla w 1866 r. genu żółtej barwy kotyledonów grochu (*Pisum sativum*) (Armstead et al. 2007) czy genu *RCT1* warunkującego odporność *M. truncatula* na antraknozę (Yang et al. 2008b). Dalszy postęp w mapowaniu genetycznym roślin bobowatych ujawnił istnienie bloków kolinearnych pomiędzy *L.*

japonicus, *P. vulgaris* i *M. truncatula*, wskazując jednak na istnienie różnego rodzaju rearanżacji (Hougaard et al. 2008). Istnienie skomplikowanego wzoru bloków kolinearnych, inwersji całych segmentów, delecji oraz insercji stwierdzono także w porównaniach pomiędzy *G. max*, *M. truncatula* i *A. thaliana* (Schlueter et al. 2008). Kolejne prace wykazały także zachowaną kolejność i orientację genów pomiędzy segmentami sekwencji genomów *L. japonicus*, *M. truncatula* i *Arachis duransensis* (Bertioli et al. 2009), przy czym warto podkreślić, że rodzaj *Arachis* wyodrębnił się z głównego pnia ewolucyjnego bobowatych mniej więcej w tym samym czasie co łubin, czyli około 50 mln lat temu. Wraz z postępem badań nad genomiką strukturalną roślin bobowatych rozwinęła się koncepcja o paleopoliploidalnym pochodzeniu tej grupy roślin, przy czym ta zaprzeszła poliploidalność miała wynikać z duplikacji całego genomu ancestralnego i/lub duplikacji całych genomów, które mogły zachodzić już niezależnie w poszczególnych liniach i być mechanizmem ich dalszej specjacji (Cannon et al. 2006; Pfeil et al. 2005). Wpływ tych hipotetycznych duplikacji na ewolucję regionów bogatych w geny, zachowawczość bloków kolinearnych, a także presję selekcyjną działająca na poszczególne geny w późniejszym okresie ewolucji był jednak nieznany. Łubin wąskolistny, jako ustabilizowany chromosomowo diploidalny przedstawiciel linii ewolucyjnej, która wyodrębniła na bardzo wczesnym etapie ewolucji bobowatych i przypuszczalnie na początku tego procesu przeszła co najmniej jedną rundę duplikacji całego genomu, stanowił atrakcyjny model do prac nad tym zagadnieniem. Dostęp do zaawansowanych na ówczesne czasy materiałów i narzędzi molekularnych, a także nabyte podczas doktoratu doświadczenie i umiejętności z zakresu genomiki strukturalnej, pozwoliły habilitantowi na podjęcie badań w tym temacie.

4.3.2. Cele naukowe osiągnięcia:

- lokalizacja regionów bogatych w geny w genomie łubinu wąskolistnego
- ocena stopnia kolinearności tych regionów w obrębie rodziny roślin bobowatych
- identyfikacja genów zduplikowanych i określenie wpływu duplikacji całych genomów na proces ewolucji tych genów

4.3.3. Materiał badawczy:

- populacja mapująca łubinu wąskolistnego składająca się z linii rekombinantów wsobnych (pokolenie F8) uzyskanych z kombinacji krzyżówkowej 83A:476 x P27255 wraz z liniami rodzicielskimi;
- biblioteka klonów BAC genomu jądrowego łubinu wąskolistnego odmiany Sonet;

4.3.4. Metody zastosowane do rozwiązania przedstawionego problemu naukowego:

- zaprojektowanie starterów do amplifikacji sond molekularnych na podstawie sekwencji markerów DNA loci SSR i sekwencji genów;
- amplifikacja PCR sond molekularnych na matrycy DNA łubinu wąskolistnego, oczyszczanie produktów PCR i znakowanie sond izotopem [α-32]P metodą heksamerową;
- hybrydyzacja sond DNA z biblioteką klonów BAC genomu jądrowego łubinu wąskolistnego i detekcja sygnałów przy użyciu kaset wizualizujących i skanera;
- identyfikacja klonów BAC wykazujących pozytywne sygnały hybrydyzacyjne w dwuwymiarowym układzie współrzędnych;
- izolacja DNA z klonów BAC i weryfikacja wyników hybrydyzacji metodą amplifikacji PCR ze starterami użytymi do amplifikacji sondy;
- sekwencjonowanie końców klonów BAC metodą Sangera;
- trawienie klonów BAC jednym lub dwoma enzymami restrykcyjnymi i elektroforeza produktów trawienia w żelu agarozowym;

- analiza elektroforegramów w programie Image3.10b i konstrukcja kontigów klonów BAC w programie FingerPrinted Contigs v 8.5.3 na podstawie wyników trawienia restrykcyjnego;
- opracowanie markerów molekularnych na matrycy sekwencji DNA końców klonów BAC (izolacja DNA z linii rodzicielskich populacji mapującej, zaprojektowanie starterów, amplifikacja PCR na matrycy DNA linii rodzicielskich, oczyszczenie produktów PCR i wysłanie do sekwencjonowania, identyfikacja loci polimorficznych, zaprojektowanie starterów wprowadzających miejsca restrykcyjne w obrębie loci polimorficznych i wybranie enzymów restrykcyjnych w programie dCAPS Finder);
- analiza segregacji tych markerów na matrycy DNA linii wsobnych populacji mapującej (wysianie roślin populacji mapującej, izolacja DNA z tych linii za pomocą gotowych zestawów, pomiar stężenia DNA metodą spektrofotometryczną, utworzenie płytek PCR ze znormalizowanym stężeniem DNA populacji mapującej, amplifikacja PCR, trawienie restrykcyjne uzyskanych produktów, elektroforeza w żelu agarozowym);
- mapowanie genetyczne markerów (zaimportowanie danych segregacji markerów z istniejącej mapy genetycznej oraz segregacji nowych markerów do programu MapManager QTXb20, rozlokowanie markerów w grupach sprzężeń na podstawie ich segregacji, wyeksportowanie wyników, narysowanie grup sprzężeń w programie MapChart);
- adnotacja funkcjonalna sekwencji końców klonów BAC jak i całych insertów klonów BAC (identyfikacja sekwencji powtarzalnych w programach RepeatMasker i Censor, predykcja sekwencji genów w programie FGENESH+ przy użyciu referencyjnych sekwencji białek z innych gatunków roślin bobowatych, zestawienie plików wynikowych z koordynatami dla poszczególnych adnotowanych elementów);
- identyfikacja kolinearnych sekwencji genomowych (maskowanie sekwencji repetytywnych w programach RepeatMasker i Censor, mapowanie sekwencji DNA do sekwencji genomów innych gatunków roślin bobowatych w programie CoGe BLAST, wizualizacja wyników mapowania przy użyciu programów Genome Synteny Viewer i Circos);
- identyfikacja sekwencji homologów badanych genów w genomach roślin bobowatych poprzez przyrównanie sekwencji referencyjnych oraz wgląd w adnotację genów (jeśli była dostępna);
- wnioskowanie filogenetyczne (przyrównanie sekwencji nukleotydowych w programie MAFFT, konstrukcja drzew filogenetycznych w programie MrBayes, obliczenie parametrów presji selekcyjnej w programie DnaSP, testowanie hipotezy o dywersyfikującej presji selekcyjnej w programie PAML4 dla poszczególnych gałęzi drzewa konsensusowego);
- analiza ekspresji genów *in silico* na podstawie danych dostępnych w atlasach ekspresji genów i innych zbiorach sekwencji transkryptomów.

Dodatkowo, w publikacjach składających się na osiągnięcie, habilitant w ramach współpracy naukowej korzystał z wyników uzyskanych następującymi metodami:

- lokalizacja klonów BAC w chromosomach mitotycznych łubinu wąskolistnego metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* z wykorzystaniem klonów BAC jako sond molekularnych (w tym także testowanie par klonów wyznakowanych różnymi znacznikami w celu określenia, czy są zlokalizowane na tych samych, czy na różnych chromosomach);
- analiza liczby kopii sekwencji metodą emulsyjnego PCR;
- profilowanie ekspresji genów metodą półilościowego PCR oraz metodą Real-Time PCR;
- a także niektórymi metodami wymienionymi wcześniej.

Szczegółowe zestawienie wykonanych przez habilitanta prac z rozdziałem na poszczególne publikacje znajduje się w załączniku nr 3a. Zestawienie analiz wykonanych przez osoby współpracujące z rozdziałem na poszczególne publikacje znajduje się w załączniku nr 4 zawierającym oświadczenia poszczególnych współautorów.

4.5. Omówienie najważniejszych wyników

Identyfikacja regionów bogatych w geny w genomie łubinu wąskolistnego przy użyciu sond molekularnych zawierających krótkie powtórzenia sekwencji i identyfikacja loci kolinearnych w sekwencjach genomów roślin bobowatych (Książkiewicz et al. 2013; Książkiewicz et al. 2015)

W ramach współpracy międzynarodowej z dr Hua'anem Yangiem z Department of Agriculture and Food Western Australia habilitant uzyskał dostęp do sekwencji starterów markera PhtjM2 opracowanego przy użyciu metody MFLP (Yang et al. 2001). W sekwencji markera genetycznego adnotowano powtórzenia sekwencji SSR: „GA" i „GT". Zastosowanie sondy molekularnej PhtjM2 do hybrydyzacji z biblioteką klonów BAC genomu jądrowego łubinu wąskolistnego pozwoliło na zidentyfikowanie 137 klonów wykazujących pozytywne sygnały hybrydyzacyjne **(Książkiewicz et al. 2013)**. Metodą fingerprintingu restrykcyjnego zgrupowano klony w 19 kontigów, reprezentujących różne regiony genomu. Uzyskano 230 sekwencji końców klonów BAC, których adnotacja funkcjonalna wykazała udział elementów repetytywnych na poziomie 23%. Jest to wartość o połowę niższa niż szacowany udział sekwencji powtarzalnych w genomie łubinu wąskolistnego (50%) (Yang et al. 2013b). Geny zidentyfikowano w 6% sekwencji końców klonów BAC. Sekwencje końców klonów BAC zdeponowano w publicznie dostępnej bazie danych DDBJ (DNA Data Bank of Japan) pod numerami akcesyjnymi **AB728840-AB729069**, natomiast sekwencję sondy pod numerem **AB748564**. Opracowano 12 polimorficznych markerów genetycznych różniących się metodą detekcji: 5 markerów allelo-specyficznych (obecność lub brak produktu PCR), 1 marker polimorfizmu długości produktu PCR, 4 markery wymagające trawienia produktu PCR enzymem restrykcyjnym (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, CAPS) (Konieczny and Ausubel 1993) i 2 markery wykorzystujące miejsca restrykcyjne wprowadzone za pomocą PCR z częściowo komplementarnymi starterami (derived CAPS, dCAPS) (Neff et al. 1998). Sekwencje markerów zdeponowano w publicznie dostępnej bazie danych STS (Sequence-Tagged Sites) NCBI (National Center for Biotechnology Information) pod numerami akcesyjnymi **GF111993-GF112014**. Metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* z wykorzystaniem klonów BAC jako sond molekularnych (BAC-FISH) zidentyfikowano 8 klonów BAC dających sygnały single locus, przydatne w analizach porównawczych. Mapowanie genetyczne markerów opracowanych na końce tych klonów BAC doprowadziło do uzyskania cytogenetycznych markerów chromosomowo-specyficznych dla 6 grup sprzężeń (NLL-03, 057J20; NLL-05, 004G15; NLL-06, 076K16 i 080B11; NLL-07, 074I10; NLL-10 077C13, 057K22; NLL-20, 083C06) co zwiększyło stopień integracji mapy genetyczno-chromosomowej z 15% do 40%. Wykonano sekwencjonowanie metodą pirosekwencjonowania 454 pięciu klonów BAC, w tym dwóch generujących w analizie BAC-FISH sygnały rozproszone na wielu chromosomach i trzech wykazujących sygnały typu single locus. Uzyskane sekwencje złożono uzyskując 2 kontigi dla klonu 055L12 (96619 pz), 4 kontigi dla 067H16 (93286 pz), 2 kontigi dla 004G15 (87008 pz), 4 kontigi dla 057J20 (87513 pz) i dwa kontigi dla 080B11 (88545 pz). Orientację i kolejność kontigów w sekwencji insertów klonów BAC określono na podstawie lokalizacji sekwencji końców klonów oraz amplifikacji PCR ze starterami zakotwiczonymi w różnych kontigach. Adnotacja funkcjonalna sekwencji tych klonów ujawniła, że rodzaj sygnału hybrydyzacyjnego w metodzie BAC-FISH zależy m.in. od zawartości elementów repetytywnych obecnych w insercie, ponieważ klony typu single locus miały udział takich sekwencji na poziomie 0.1-18.0%, zaś klony „repetytywne" 33.6-41.0%. Sekwencje klonów BAC wraz z adnotacją zdeponowano w publicznie dostępnej bazie danych European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute Nucleotide Sequence Database (EMBL) pod następującymi numerami akcesyjnymi: klon 004G15 (**HE804808**), 055L12 (**HE804809**), 057J20 (**HE804810**), 067H16 (**HE804811**), 080B11 (**HE804812**). Dwa z badanych klonów reprezentowały regiony bogate w geny: klon 004G15 zawierający 14 genów (co w przeliczeniu daje współczynnik 16 genów / 100 kpz) i klon 080B11 zawierający 11 genów (12 genów/ 100 kpz). Na drodze mapowania porównawczego do sekwencji genomu soi zidentyfikowano dla obu badanych klonów po dwa regiony kolinearne o identycznej kolejności i orientacji genów. Zaobserwowano, że długość tych regionów u soi jest co najmniej dwa razy dłuższa niż u łubinu wąskolistnego, co wynikało z nagromadzenia licznych rozproszonych

drobnych insercji / delecji (INDEL) (klon 004G15) oraz dwóch dużych INDELi o długości ok. 40-50 kpz (klon 080B11). Zidentyfikowanie sekwencji zachowawczych o bardzo wysokim poziomie kolinearności, zawierających kopie genów homologiczne w rodzinie roślin bobowatych, stanowiło istotną podstawę do wnioskowania o możliwości definitywnego transferu informacji w obrębie regionów bogatych w geny z roślin o zaawansowanej adnotacji funkcjonalnej do sekwencji z genomu łubinu wąskolistnego. Uzyskane wyniki zamieszczono w recenzowanej publikacji oryginalnej w czasopiśmie typu open access (BMC Genomics), w której habilitant jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym **(Książkiewicz et al. 2013)**.

W toku prac badawczych wykonywanych w ramach rozprawy doktorskiej habilitanta pt.: „Struktura i organizacja regionów genomu warunkujących odporność na grzyby patogeniczne u łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.)" użyto zestaw czterech sond (AntjM1, AntjM2, Ph258M2 i RustM1) do hybrydyzacji z biblioteką genomu jądrowego łubinu wąskolistnego. W sekwencji sond zidentyfikowano liczne powtórzenia motywów SSR, a w zwłaszcza trinukleotydów „TTG", „GTT", „TTC" i „TTG" oraz dinukleotydów „GA". W wyniku hybrydyzacji wyselekcjonowano 124 klony BAC wykazujące pozytywne sygnały hybrydyzacyjne. Otrzymano 243 sekwencje końców klonów BAC, których adnotacja funkcjonalna ujawniła udział frakcji repetytywnego DNA na poziomie 38.3%, zaś sekwencji genowych - 27.3%. Na podstawie wyników fingerprintingu restrykcyjnego DNA wyizolowanego z klonów BAC skonstruowano 14 kontigów. Na matrycy sekwencji końców klonów BAC wygenerowano 35 polimorficznych markerów, które zlokalizowano w 14 grupach sprzężeń. Część tych wyników zawarto w publikacjach w języku polskim **(Wolko et al. 2010)** i angielskim **(Książkiewicz et al. 2008)**, zaś szczegółowe opracowanie w rozprawie doktorskiej.

Uzyskany materiał (klony BAC, sekwencje końców klonów BAC i wygenerowane markery genetyczne) stanowił podstawę do dalszych badań wykonywanych po doktoracie. Łącząc mapowanie genetyczne z wynikami analiz BAC-FISH uzyskanymi w ramach współpracy naukowej otrzymano 6 cytogenetycznych markerów chromosomowo-specyficznych dla 5 grup sprzężeń (NLL-01, 043C18; NLL-09, 015P08; NLL-14, 138N02 i 115C21; NLL-16, 072O21; NLL-20, 017B07), zwiększając poziom integracji mapy genetyczno-chromosomowej z 40% do 60%. Sekwencje końców klonów BAC zdeponowano w publicznie dostępnych bazach danych GSS (Genome Survey Sequences) DDBJ (**AB809166-AB809361**) oraz NCBI (**HR864171-HR864217**). Sekwencje markerów zdeponowano w publicznie dostępnych bazach STS NCBI (**GF110936-GF110969**) oraz DDBJ (**AB811081-AB811182**, **AB811255-AB811351** i **AB811459-AB811463**). Na podstawie wyników mapowania fizycznego i genetycznego wybrano 5 klonów BAC do sekwencjonowania całych insertów. Otrzymano sekwencje insertów dla następujących klonów BAC: 017B07 (109008 pz), 075D16 (98086 pz), 112N18 (43842 pz), 119M23 (97240 pz) i 136B16 (103792 pz). W złożonych sekwencjach zidentyfikowano dwa regiony bogate w geny, w klonach 017B07 (21 genów, 19 genów/ 100 kpz) i 080K03 (19.6 genów/ 100 kpz). Sekwencje klonów BAC wraz z adnotacją zdeponowano w publicznie dostępnej bazie danych EMBL pod następującymi numerami akcesyjnymi: 017B07 (**HF937076.1**), 112N18 (**HF937077.1**), 119M23 (**HF937078.1**), 136B16 (**HF937079.1**) i 0756D16 (**HF937080.1**). Mapowanie końców klonów BAC do opublikowanej wstępnej sekwencji genomu łubinu wąskolistnego doprowadziło do identyfikacji 18 kontigów zawierających regiony bogate w geny (15-32 geny/ 100 kpz). Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że ze względu na fragmentację sekwencji genomu, średnia długość tych kontigów była znacznie krótsza niż uzyskane sekwencje insertów klonów BAC. Adnotacja funkcjonalna sekwencji końców i całych insertów klonów BAC oraz przypisanych kontigów wykazała obecność m.in. motywów SSR typu „AG", „AC", „AGG", „AAC". Z danych literaturowych wynika, że są to typowe motywy dla regionów bogatych w geny (Belarmino et al. 2012; Mun et al. 2006; Temnykh et al. 2001).

Na drodze mapowania porównawczego zidentyfikowano segmenty kolinearne pomiędzy regionami genomów 5 gatunków roślin bobowatych (*Cajanus cajan*, *G. max*, *L. japonicus*, *M. truncatula* i *P. vulgaris*) a regionami genomu łubinu wąskolistnego bogatymi w geny, reprezentowanymi przez

sekwencje klonu 017B07 i trzech kontigów: KB415871, KB432947 i KB433973. Zaobserwowano występowanie duplikacji regionów kolinearnych u wszystkich badanych gatunków (u *G. max* zazwyczaj 4 kopie, u pozostałych 2) oraz rearanżacje strukturalne występujące zazwyczaj w jednej z kopii (inwersje u *P. vulgaris* i *L. japonicus*, insercje u *G. max*). Długość bloków syntenicznych była zazwyczaj znacznie większa niż długość analizowanych sekwencji łubinu wąskolistnego, a mianowicie regiony kolinearne *C. cajan* i *M. truncatula* były dłuższe średnio ok. 3×, zaś *G. max*, *L. japonicus* i *P. vulgaris* ok. 5-6×. Biorąc pod uwagę poziom zachowawczości tych sekwencji oraz brak istotnych rearanżacji strukturalnych wyciągnięto wniosek, że zidentyfikowane regiony, zachowane u badanych przedstawicieli reprezentujących główne klady *Papilionoideae*: genistoids (*Lupinus*), dalbergioids (*Arachis*), millettioids (*Cajanus*, *Glycine*, *Phaseolus*), IRLC (*Medicago*) i robinioids (*Lotus*), są pozostałościami genomu ancestralnego. Fakt zidentyfikowania silnie wyrażonych loci kolinearnych pomiędzy regionami genomów *C. cajan*, *P. vulgaris* and *G. max* ma uzasadnienie w przebiegu procesu ewolucji tych gatunków. Są to przedstawiciele kladu *Phaseolus*, który oddzielił się od kladu IRLC około 54 mln lat temu. Gałąź ewolucyjna *C. cajan* wyodrębniła się około 26 mln lat temu, zaś *P. vulgaris* i *G. max* około 19 mln lat temu (Lavin et al. 2005; Stefanović et al. 2009). Porównanie genomów *P. vulgaris* i *G. max* ujawniło istnienie 55 bloków makrosyntenicznych o średniej długości około 5 Mpz (McClean et al. 2010). Bloki te zawierają m.in. regiony kolinearne zidentyfikowane w niniejszej pracy. Uzyskane wyniki zamieszczono w recenzowanej publikacji oryginalnej w czasopiśmie z dostępem typu open access (Plant Molecular Biology Reporter), w której habilitant jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym **(Książkiewicz et al. 2015)**

Identyfikacja regionów bogatych w geny w genomie łubinu wąskolistnego wykazujących wysoki stopień kolinearności w obrębie rodziny roślin bobowatych przy użyciu sond zakotwiczonych w sekwencjach genów, identyfikacja genów zduplikowanych i określenie wpływu duplikacji całych genomów na proces ewolucji tych genów **(Książkiewicz et al. 2016; Narożna et al. 2017; Przysiecka et al. 2015; Szczepaniak et al. 2018).**

Bibliotekę klonów BAC wykorzystywano również do hybrydyzacji z sondami zaprojektowanymi na podstawie sekwencji kodujących, a mianowicie sekwencji genów ze szlaku syntezy flawonoidów i izoflawonoidów (izomeraza chalkonowa, syntaza izoflawonowa), szlaku indukcji kwitnienia w odpowiedzi na fotoperiod i wernalizację (gen *FLOWERING LOCUS T*) oraz szlaku syntezy kwasów tłuszczowych (karboksylaza acetylo-koenzymu A) **(Książkiewicz et al. 2016; Narożna et al. 2017; Przysiecka et al. 2015; Szczepaniak et al. 2018)**.

Flawonoidy są grupą organicznych związków chemicznych, które są produkowane w roślinach jako metabolity wtórne, uczestniczące w zróżnicowanych procesach biologicznych, takich jak nadawanie barwy kwiatów, ochrona przed promieniowaniem ultrafioletowym i stresem osmotycznym, regulacja cyklu komórkowego, transport auksyn i ochrona przed patogenami (Peer and Murphy 2007; Woo et al. 2005). Flawonoidy pełnią także rolę w interakcjach symbiotycznych między roślinami a mikroorganizmami, w tym typowej dla roślin bobowatych symbiozie diazotroficznej (Subramanian et al. 2007). Jednym z kluczowych enzymów szlaku biosyntezy flawonoidów jest izomeraza chalkonowa (*CHI*). Sekwencje z rodziny izomeraz chalkonowych dzieli się na trzy główne grupy, izomerazy chalkonowe typu I i II (*CHI1*/*TT5* i *CHI2*), izomerazy chalkonowo-podobne (*CHIL*/*CHI4*) oraz białka wiążące kwasy tłuszczowe (*FAP*), dzielone na trzy podgrupy (*FAPa1*/*CHI3B*, *FAPa2*/*CHI3C* oraz *FAPb*/*CHI3A*) (Ngaki et al. 2012). Do przeszukiwania biblioteki klonów BAC genomu łubinu wąskolistnego użyto sondy molekularnej zakotwiczonej w sekwencji genu z grupy **izomeraz chalkonowo-podobnych** (*CHIL*). Funkcja genów *CHIL* jest stosunkowo mało poznania. Uważa się, że geny te mogą stymulować produkcję flawonoidów i uczestniczyć w nadawaniu barwy kwiatów (Morita et al. 2014). Zastosowanie sondy zakotwiczonej w sekwencji genu *CHIL* umożliwiło wyselekcjonowanie z biblioteki BAC genomu jądrowego łubinu wąskolistnego 8 klonów, które przy użyciu trawienia restrykcyjnego zgrupowano w dwa kontigi **(Przysiecka et al. 2015)**. Otrzymano 16 sekwencji końców klonów BAC, z których połowa zawierała regiony o wysokim stopniu podobieństwa

do sekwencji kodujących. Sekwencje końców klonów BAC zdeponowano w publicznie dostępnej bazie danych DDBJ (**AB749285-AB749300**). Na matrycy sekwencji DNA dwóch klonów BAC (każdy z innego kontigu) opracowane zostały dwa markery genetyczne, które zlokalizowano w różnych grupach sprzężeń. Ponieważ niektóre klony wykazały w metodzie BAC-FISH specyficzne sygnały hybrydyzacyjne typu single locus, uzyskano w ten sposób cytogenetyczne markery chromosomowo-specyficzne dla grup sprzężeń NLL-03 (028O01, 088J04, 115L05, 115N04) i NLL-15 (005L11, 134F01). Mapowanie sekwencji końców klonów BAC do sekwencji genomu łubinu wąskolistnego pozwoliło na wyselekcjonowanie 4 skafoldów i ułożenie ich w odpowiedniej orientacji. Uzyskano dwa kontigi reprezentujące regiony bogate w geny: kontig nr 1 zawierający 10,6 genów / 100 kpz i kontig nr 2 o gęstości 9,9 genów / 100 kpz. W obu kontigach adnotowano po jednej kopii genu z rodziny izomeraz chalkonowo-podobnych, które nazwano odpowiednio *LangCHIL1* i *LangCHIL2*. Sekwencje genów zdeponowano w publicznie dostępnej bazie danych Genbank NCBI (**HE999614.1** i **HE999615.1**). Adnotacja funkcjonalna sekwencji z genomu i transkryptomu łubinu wąskolistnego oraz transkryptomu łubinu białego i żółtego wykazała istnienie co najmniej 8 homologów z rodziny izomeraz chalkonowych u *L. angustifolius*, 11 u *L. albus* i 6 u *L. luteus*. W genomie łubinu wąskolistnego zaobserwowano duplikacje sekwencji z podrodziny izomeraz chalkonowych typu I *(AtCHI*/*TT5*), III (*AtFAPa2*) i IV (*AtCHIL*/*CHI4*) oraz brak sekwencji typu II (*CHI1*). Podobny wzór duplikacji zaobserwowano dla sekwencji z transkryptomu łubinu białego. Na podstawie danych literaturowych (Chu et al. 2014; Dastmalchi and Dhaubhadel 2015; Liu et al. 2015; Ngaki et al. 2012) oraz adnotacji sekwencji dostępnych w publicznych bazach danych zidentyfikowano istnienie duplikacji tych genów także u innych przedstawicieli bobowatych, a w szczególności u *G. max*, *M. truncatula* i *P. vulgaris*. Wnioskowanie filogenetyczne w puli 77 sekwencji z rodziny izomeraz chalkonowych wykazało, że wszystkie duplikacje tych genów w obrębie rodzaju *Lupinus* były liniowo-specyficzne, przy czym większość zduplikowanych loci powstała u wspólnego przodka rodzaju *Lupinus*, przed rozejściem się linii ewolucyjnych prowadzących do powstania gatunków *L. angustifolius*, *L. albus* i *L. luteus*. Istnienie niezależnych, liniowo specyficznych duplikacji genów z rodziny izomeraz chalkonowych zaobserwowano także u pozostałych gatunków bobowatych posiadających zwielokrotnione kopie tych genów, *G. max*, *M. truncatula* i *P. vulgaris*. Mapowanie porównawcze sekwencji kontigów *LangCHIL1* i *LangCHIL2* do sekwencji genomów 6 gatunków roślin bobowatych (*Cicer arietinum*, *C. cajan*, *G. max*, *L. japonicus*, *M. truncatula*, *P. vulgaris*) wykazało istnienie bloków kolinearnych u wszystkich badanych gatunków. Oba kontigi mapowały się do tych samych regionów zawierających kopie sekwencji z rodziny izomeraz chalkonowych, przy czym kontig *LangCHIL1* nagromadził znacznie więcej rearanżacji strukturalnych niż kontig *LangCHIL2*. Sekwencje skafoldów z genomu łubinu wąskolistnego zawierające geny *FAPa1*, *FAPa2* i *CHI2* posiadały loci kolinearne w genomach roślin bobowatych kodujących odpowiadające kopie genów. Podsumowując, analizy mikro- i makrosynteniczne wykazały znaczny poziom zachowawczości regionów genomu łubinu wąskolistnego zawierających geny *LangCHIL1* i *LangCHIL2* w obrębie roślin bobowatych. Loci kolinearne zawierają kopie genów *CHIL* (Glyma04g40030, Glyma06g14820, XM_004502772, Medtr3g093980, Phvul.009G143100), które na drzewie genowym zlokalizowano w obrębie jednej grupy monofiletycznej. Obserwacje te są zgodne z wynikami uzyskanymi w puli 47 sekwencji z rodziny izomeraz chalkonowych z 7 gatunków roślin (*A. thaliana*, *Oryza sativa*, *Vitis vinifera*, *M. truncatula*, *G. max*, *P. vulgaris* i *C. arietinum*) (Chu et al. 2014). Ta gałąź filogenetyczna zawiera, oprócz wymienionych 5 sekwencji, AT5G05270 z *A. thaliana*, Os12g02370 i Os11g02440 z *O. sativa* i GSVIVT01032685001 z *V. vinifera*. Wyniki mapowania porównawczego i analiz filogenetycznych wskazały, że genom ancestralny *Lupinus* posiadał jedną kopię genu *LangCHIL*. Druga kopia pojawiła się najprawdopodobniej w wyniku duplikacji całego genomu. Region *LangCHIL2* zachował pierwotną strukturę, zaś region *LangCHIL1* został poddany rearanżacjom (np. w procesie tasowania chromosomów), których pozostałości można zaobserwować obecnie w postaci zaburzenia kolinearności w przyległych regionach grupy sprzężeń NLL-03. Geny zduplikowane często podlegają procesom pseudogenizacji, sub-funkcjonalizacji bądź neo-funkcjonalizacji, która może prowadzić do ich dywergencji (Blanc and Wolfe 2004; Cusack and Wolfe 2007; Moore and Purugganan 2005). W przypadku genów *LangCHIL1* i *LangCHIL2* nie zaobserwowano istotnych różnic zarówno w poziomie,

jak i profilu ekspresji genów w różnych tkankach. O ewolucyjnym udziale duplikacji całego genomu można wnioskować także w przypadku genu *CHI2*, gdyż oba skafoldy łubinu wąskolistnego (KB438712.1 i KB432257.1) zawierające kopie tego genu wykazały loci kolinearne do tych samych sekwencji z genomów roślin bobowatych. Uzyskane wyniki zamieszczono w recenzowanej publikacji oryginalnej w czasopiśmie typu open access (Frontiers in Plant Science), w której habilitant jest drugim autorem i autorem korespondencyjnym **(Przysiecka et al. 2015)**.

Linie dzikie łubinu wąskolistnego w celu indukcji kwitnienia wymagają okresu niskiej temperatury w okresie kiełkowania nasion lub we wczesnej fazie wzrostu roślin. Proces ten nazywany jest wernalizacją i stanowi ewolucyjne przystosowanie do strefy klimatycznej, zabezpieczając przed rozpoczęciem kwitnienia w okresie o niekorzystnych warunkach pogodowych (np. w środku lata). W procesie udomowienia łubinu wąskolistnego zaobserwowano wystąpienie spontanicznej mutacji o dominacyjnym typie dziedziczenia (*Ku*), która doprowadziła do zniesienia wymagań wernalizacyjnych i skrócenia czasu potrzebnego na rozpoczęcie kwitnienia o kilka tygodni. W wyniku prac nad konstrukcją pierwszej mapy genetycznej łubinu wąskolistnego zawierającej markery sekwencyjnie zdefiniowane, w których habilitant uczestniczył jako współautor, zaobserwowano, że locus *Ku* zlokalizowany jest w regionie kolinearnym do fragmentu chromosomu 7 *M. truncatula*, który zawiera m.in. sekwencje homologów genu ***FLOWERING LOCUS T* (*FT*) (Nelson et al. 2006)**. To odkrycie zapoczątkowało prace ukierunkowane na identyfikację genu warunkującego termoneutralność łubinu wąskolistnego. Na podstawie przyrównania sekwencji genu *FTc* z *L. albus*, *M. truncatula*, *G. max* i *P. sativum* zidentyfikowane zostały konserwatywne regiony w drugim i trzecim eksonie tego genu, które stanowiły matrycę do zaprojektowania pary starterów flankujących drugi intron **(Nelson et al. 2017)**. W wyniku amplifikacji PCR otrzymano dwa produkty o długości 231 pz i 293 pz. Sekwencje tych produktów uzyskanych na matrycy DNA łubinu wąskolistnego odmiany Sonet oraz linii 83A:476 i P27255 zdeponowano w publicznie dostępnej bazie danych GSS NCBI (**KS366026-KS366027** i **KS366029-KS366032**). Produkty PCR użyto jako sondy molekularne do przeszukiwania biblioteki klonów BAC genomu jądrowego łubinu wąskolistnego. Wyselekcjonowano 12 klonów amplifikujących produkt PCR dla krótszej sondy i 5 klonów dla dłuższej. Metodą restrykcyjnego fingerprintingu klony zestawiono w dwa kontigi, których skład był tożsamy z wynikami hybrydyzacji **(Książkiewicz et al. 2016)**. Uzyskano sekwencje końców dla wszystkich klonów BAC z obu kontigów, które zdeponowano w publicznie dostępnej bazie danych GSS NCBI (**LC054229-LC054262**). Na matrycy DNA sekwencji końców klonów BAC zaprojektowano 10 polimorficznych markerów genetycznych (2 markery allelo-specyficznego PCR, 3 markery polimorfizmu długości produktu PCR, 4 markery CAPS i 1 marker dCAPS). Markery te umożliwiły zlokalizowanie obu kontigów na mapie genetycznej (kontig nr 1 w grupie sprzężeń NLL-10 i kontig nr 2 w grupie sprzężeń NLL-17) i ustalenie ich orientacji. Sekwencje markerów zdeponowano w publicznie dostępnej bazie danych STS DDBJ (**LC057104-LC057135**). Na drodze współpracy naukowej klony BAC poddane zostały mapowaniu fizycznemu w chromosomach metafazowych łubinu wąskolistnego metodą BAC-FISH. Zestawiając wyniki tej analizy z wynikami mapowania genetycznego markerów zakotwiczonych w sekwencjach końców klonów BAC uzyskano pięć cytogenetycznych chromosomowo-specyficznych markerów dla grupy sprzężeń NLL-10 (006C24, 015A19, 075P11, 082M07, 133N08) i jeden dla grupy NLL-17 (042F24). Uzupełniły one pulę już istniejących markerów dla grupy sprzężeń NLL-10 (057K22 i 077C13) opracowanych w ramach innej publikacji wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego **(Książkiewicz et al. 2013)**. Sekwencje klonów BAC wydłużono o nachodzące nań kontigi sekwencji genomu łubinu wąskolistnego, tworząc superkontigi o długości 208734 pz i 189931 pz. Adnotacja funkcjonalna wykazała obecność jednej kopii genu *FT* w każdym z superkontigów, które nazwano odpowiednio *LanFTc1* i *LanFTc2*. Gęstość genów w superkontigach oszacowano odpowiednio na 1,9 i 3,2 genów / 100 kpz. Sekwencje superkontigów poddano mapowaniu porównawczemu do sekwencji genomów 9 gatunków bobowatych. Dla sekwencji superkontigu nr 1 zidentyfikowano po jednym regionie kolinearnym w genomach *A*. *duranensis*, *A. ipaensis*, *C*. *cajan*, *C*. *arietinum*, *L*. *japonicus* , *M*. *truncatula*, *P*. *vulgaris* i *Vigna radiata* oraz dwa regiony w genomie *G*. *max*. We wszystkich tych regionach za wyjątkiem *L*. *japonicus* adnotowano jedną kopię genu *FT*. Do sekwencji superkontigu nr 2 także przypisano dwa

regiony kolinearne w genomie *G*. *max* i po jednym regionie kolinearnym u pozostałych gatunków, aczkolwiek żaden z tych regionów nie zawierał sekwencji genu *FT*. Wskazywało to na ancestralne pochodzenie regionu reprezentowanego przez superkontig nr 1 oraz powstanie kopii genu *LanFTc2* na drodze duplikacji o lokalnym zasięgu. W celu potwierdzenia tej hipotezy wykonano przyrównanie grup sprzężeń NLL-10 i NLL-17 (z mapy genetycznej uaktualnionej o nowe markery wygenerowane w niniejszej pracy) do wstępnej sekwencji genomu łubinu wąskolistnego. Następnie, grupy sprzężeń z przypisanymi kontigami sekwencji genomu łubinu wąskolistnego poddano mapowaniu porównawczemu w puli 9 gatunków bobowatych. Dla obu grup sprzężeń uzyskano wyraźne wzory loci kolinearnych, które obejmowały regiony zidentyfikowane wcześniej przy użyciu sekwencji superkontigów. Superkontig nr 1 znajdował się wewnątrz regionu kolinearnego o długości 15.3 cM, zaś superkontig nr 2 na samym skraju regionu kolinearnego o długości 20.4 cM, z załamaniem syntenii tuż przed sekwencją genu *LanFTc2* **(Książkiewicz et al. 2016)**. Był to kolejny dowód na powstanie genu *LanFTc2* w wyniku lokalnej duplikacji.

Gen *FT* należy do rodziny genów białek wiążących fosfatydyloetanoloaminę (ang. *Phosphatidyl Ethanolamine-Binding Proteins*, PEBP). Oprócz genu *FT*, rodzina ta grupuje także geny *TWIN SISTER OF FT* (*TSF*), *TERMINAL FLOWER1* (*TFL1*), *MOTHER OF FT AND TFL1* (*MFT*) oraz *BROTHER OF FT AND TFL1* (*BFT*). Metodą mapowania porównawczego i adnotacji funkcjonalnej sekwencji genomów 10 gatunków roślin bobowatych zidentyfikowano 118 homologów genów z rodziny PEBP: 33 sekwencje *TFL1*, 26 *FTa*, 25 *FTb*, 14 *MFT* i po 10 *FTc* oraz *BFT*. Należy zwrócić uwagę, że nie zidentyfikowano ani jednej kopii genu *FTc* w genomach *C. cajan* i *L. japonicus*, *FTb* w genomie *L. angustifolius* i *BFT* w genomie *L. japonicus*. Zidentyfikowano 17 regionów zawierających zgrupowane w niewielkiej odległości co najmniej dwie kopie genu *FT*: po jednym regionie u *A. duranensis* i *C. cajan*, po dwa regiony u *A. ipaensis*, *C. arietinum*, *M. truncatula*, *P. vulgaris* i *V. radiata* oraz pięć regionów u *G. max*. Były to głównie sekwencje z kladu *FTb* i sporadycznie *FTa* oraz *FTc*. Wnioskowanie filogenetyczne wykazało istnienie szeregu duplikacji w poszczególnych liniach: *C. arietinum*, dwie duplikacje *TFL1*; *G. max*, dwie duplikacje *TFL1* oraz po jednej *BFT*, *FTa* i *FTc*; *V. radiata* i *M. truncatula*, po jednej duplikacji *FTb*; *L. angustifolius*, po jednej duplikacji *FTa*, *FTc* i *MFT* oraz dwie T*FL1*. Duplikacje zaobserwowano także na pozycjach węzłów łączących spokrewnione gatunki, np. u hipotetycznego przodka *A. duranensis* i *A. ipaensis* (*FTa*, *FTb* i *MFT*) oraz u przodka *C. arietinum* i *M. truncatula* (*FTa*). Analiza presji selekcyjnej na podstawie substytucji nukleotydowych wykazała, że zduplikowane geny były poddane selekcji oczyszczającej. Zaobserwowano natomiast dużą zmienność regionów promotorowych. Tylko dwa motywy zachowawcze (Re-alpha i kaseta CCAAT) zachowały typową dla genu *FT* pozycję i orientację.

Uzyskane wnioski są zgodne z ogólną hipotezą o ancestralnym charakterze sekwencji *MFT* i powstaniu genu *FT*/*TFL1* na drodze duplikacji genu *MFT* w linii ewolucyjnej oddzielającej się od kladu *Lycopodiophyta* (widłaki) (Karlgren et al. 2011; Wang et al. 2015), co przyczyniło się do radiacji ewolucyjnej roślin nasiennych (Hedman et al. 2009). Prawdopodobnie w wyniku kolejnej duplikacji powstały geny *FT* i *TFL1* kodujące białka o antagonistycznych funkcjach regulatorowych, które miały udział w ewolucji roślin okrytonasiennych (Fan et al. 2014; Karlgren et al. 2011). Gen *TFL1* prawdopodobnie uległ co najmniej dwóm rundom duplikacji, przy czym pierwsza nastąpiła stosunkowo wcześnie i dała początek grupie genów *BFT*, zaś druga wystąpiła w linii ewolucyjnej *Papilionoideae* i doprowadziła do zwielokrotnienia liczby kopii *TFL1* (Wang et al. 2015). Specyficzne dla bobowatych duplikacje wystąpiły także w przypadku genu *FT*, dając początek trzem kladom, *FTa*, *FTb* i *FTc* (Wang et al. 2015). W pracy **(Książkiewicz et al. 2016)** potwierdzono, że geny *MFT* i *TFL1* uległy zwielokrotnieniu liczby kopii zdecydowanie wcześniej niż miała miejsce hipotetyczna duplikacja genomu ancestralnego linii bobowatych (~157 and ~117 mln lat temu vs ~48-65 mln lat temu) (Cannon et al. 2010; Cannon et al. 2015; Lavin et al. 2005; Schlueter et al. 2004; Varshney et al. 2013). Oszacowany czas powstania podstawowych kopii genów *FTa* i *FTb* (~76 i ~65 mln lat temu) jest natomiast zbieżny z datowaniem tej duplikacji. Przeprowadzone badania wykazały też zbieżność w czasie liniowo-specyficznych duplikacji genów *FTa*, *FTb* and *FTc*, oszacowanych na 24-29 mln lat

temu. Wyniki adnotacji sekwencji genomowych, mapowania porównawczego i wnioskowania filogenetycznego wskazują, że do zwiększenia liczby kopii homologów *PEBP* u roślin bobowatych przyczyniły się najprawdopodobniej zarówno duplikacje całego genomu występujące w poszczególnych liniach ewolucyjnych jak i duplikacje o charakterze lokalnym (np. tandemowe). Uzyskane wyniki zamieszczono w recenzowanej publikacji oryginalnej w czasopiśmie typu open access (BMC Genomics), w której habilitant jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym (**Książkiewicz et al. 2016**).

Jedną z charakterystycznych cech roślin bobowatych jest produkcja izoflawonoidów, metabolitów wtórnych uczestniczących w interakcjach między roślinami i mikroorganizmami, zarówno w procesach symbiotycznych jak i patogenicznych (Dixon and Ferreira 2002; Kosslak et al. 1987). Biosyntezę izoflawonoidów obserwuje się także u niektórych przedstawicieli roślin nie należących do rodziny bobowatych, ale jest to zjawisko relatywnie rzadkie (Lapcik 2007). Kluczowym enzymem odpowiadającym za produkcję izoflawonoidów jest **syntaza izoflawonowa** (IFS), która będąc pierwszym ogniwem enzymatycznym odgałęzienia szlaku syntezy fenylopropanoidów odpowiada za biosyntezę prekursorów izoflawonoidów (Pičmanová et al. 2013). W wyniku hybrydyzacji sondy na gen *IFS* z biblioteką BAC genomu jądrowego łubinu wąskolistnego wyselekcjonowano 6 klonów, które na podstawie długości amplifikowanego produktu PCR podzielono na trzy grupy: 1495 pz (062L01 i 137G21), 372 pz (136E13) i 161 pz (082N10, 070J20 i 120F10). Fingerprinting restrykcyjny potwierdził, że te grupy reprezentują trzy różne regiony w genomie łubinu wąskolistnego. Na podstawie wyników lokalizacji klonów metodą BAC-FISH w chromosomach łubinu wąskolistnego wybrano z każdej grupy do dalszych analiz po jednym klonie, który generował sygnały typu single locus. Mapowanie genetyczne markerów molekularnych zaprojektowanych na matrycy sekwencji DNA końców klonów BAC wykazało, że klony te zlokalizowane są w różnych grupach sprzężeń: klon 062L01 w grupie NLL-19, 136E13 w NLL-16 i 082N10 w NLL-06. Uzyskano w ten sposób trzy chromosomowo-specyficzne markery cytogenetyczne. Sekwencjonowanie insertów klonów BAC i przyrównanie uzyskanych sekwencji do kontigów genomu łubinu wąskolistnego pozwoliło na konstrukcję trzech superkontigów: 062L01 (o długości 63384 pz), 082N10 (98938 pz) i 136E13 (82829 pz). Adnotacja funkcjonalna sekwencji superkontigów wykazała, że reprezentują one regiony bogate w geny o gęstości rzędu 6-11 genów / 100 kpz i niskiej zawartości elementów repetytywnych (2,8-6,3%). W każdym z superkontigów adnotowano po jednej kopii *IFS*, które nazwano *LangIFS1* (062L01), *LangIFS2* (136E13) i *LangIFS3* (082N10). Sekwencje klonów BAC wraz z adnotacją zdeponowano w publicznie dostępnej bazie danych EMBL pod następującymi numerami akcesyjnymi: **LT577944.1** (006L21), **LT577945.1** (082N10) i **LT577946.1** (136E13). Mapowanie porównawcze do sekwencji genomów dziewięciu gatunków roślin bobowatych ujawniło istnienie wspólnych loci kolinearnych do regionów zawierających homologi genów *IFS* u poszczególnych gatunków dla wszystkich trzech superkontigów, przy czym region 082N10 cechował się najwyższym poziomem zachowawczości sekwencji. Taki wzorzec współdzielonych bloków syntenicznych faworyzuje hipotezę o udziale liniowo-specyficznej duplikacji całego genomu w ewolucji genów *IFS* łubinu wąskolistnego. W celu identyfikacji potencjalnych homologów genu *IFS* wykonano przeszukiwanie sekwencji genomów 12 gatunków bobowatych z podstawowych kladów (dalbergioids, genistoids, IRLC, robinioids, millettoids) oraz sekwencji transkryptomów 22 gatunków obejmujących także klady, które oddzieliły się od głównego pnia ewolucyjnego wcześniej niż linie *Lupinus* i *Arachis*: Cercideae, Detarieae, Mimosoid/MCC, mirbelioids i wczesne linie *Papilionoideae*. Sekwencje IFS zidentyfikowano we wszystkich badanych kladach oprócz Cercideae, Detarieae i Mimosoid/MCC.

Profilowanie ekspresji zarówno metodą półilościową dla *L. angustifolius* jak i *in silico* dla roślin bobowatych wykazało, że wszystkie kopie *IFS* u łubinu oraz niemal wszystkie kopie u pozostałych gatunków są aktywne transkrypcyjne, przy czym najwyższy poziom transkryptów występował w korzeniach. Z danych literaturowych wynika, że np. u łubinu białego i żółtego znaczna liczba związków z grupy izoflawonoidów jest wydzielana przez korzenie (Cesco et al. 2010). Jest to związane z funkcją izoflawonoidów, polegającą na regulacji populacji mikrobów w obrębie ryzosfery m.in. w celu

kontroli interakcji w ramach symbiozy, mikoryzy bądź patogenezy. Niższy poziom ekspresji izoflawonoidów w liściach i łodygach jest związany z faktem, że biosynteza izoflawonoidów w tych organach jest indukowana w odpowiedzi na stresy biotyczne (Wojakowska et al. 2015; Wojakowska et al. 2013). Rośliny w doświadczeniach ukierunkowanych na poznanie ekspresji genów utrzymywane były w warunkach kontrolowanych, z unikaniem wpływu dodatkowych czynników takich jak stresy biotyczne i abiotyczne. Analiza ekspresji metodą półilościową w pięciu organach *L. angustifolius* nie wykazała znacznych różnic między poszczególnymi kopiami genów *IFS* wskazujących na ich ewentualne zróżnicowanie funkcjonalne. Ocena poziomu ekspresji metodą *in silico* na podstawie transkryptomicznych danych sekwencyjnych dziesięciu gatunków bobowatych ujawniła hipotetyczną sub-funkcjonalizację zduplikowanych genów *IFS* u *G. max* i *L. japonicus*. Z danych literaturowych wynika, że kopie genu *IFS* u *G. max* różnią się profilami ekspresji na różnych etapach rozwoju oraz w odpowiedzi na stresy biotyczne i abiotyczne (Dhaubhadel et al. 2003; Gutierrez-Gonzalez et al. 2010; Subramanian et al. 2004).

Wnioskowanie filogenetyczne pozwoliło na utworzenie konsensusowego drzewa genowego, strukturalnie zgodnego z hipotetycznym przebiegiem ewolucji roślin bobowatych. Gałęzie ewolucyjne w obrębie kladu genistoids (*Lupinus*) były najdłuższe w całym drzewie genowym, co wskazywało na szybsze tempo ewolucji w obrębie tego kladu. Struktura drzewa genowego wskazała na liniowo-specyficzne duplikacje genów *IFS* we wszystkich głównych kladach *Papilionoideae*. Wykonano analizę sekwencji aminokwasowych *IFS* w obrębie bloków o istotnym znaczeniu funkcjonalnym oraz regionów o wysokim poziomie zachowawczości. Wykazano potencjalną pseudogenizację jednej z kopii *P. vulgaris* oraz niesynonimiczne substytucje w sekwencji sygnałowej kierującej do retikulum endoplazmatycznego u *Lupinus* spp. i *Arachis* spp. Różnice te mogą wynikać z dystansu filogenetycznego dzielącego te linie ewolucyjne od innych, później wyodrębnionych kladów *Papilionoideae* jak i ogólnej zmienności tego typu sekwencji (Cannon et al. 2015; Kim and Hwang 2013). Porównanie współczynników niesynonimicznych i synonimicznych substytucji dla 20 par zduplikowanych kopii *IFS* wykazało obecność silnej oczyszczającej presji selekcyjnej. Jest to typowy wynik dla enzymów ulokowanych na początku istotnego szlaku metabolicznego, wypływających na wiele produktów końcowych (Cork and Purugganan 2004; Olson-Manning et al. 2013). Podobny wynik uzyskano dla innych genów kontrolujących szlak syntezy izoflawonoidów u *G. max*: reduktazy chalkonowej, syntazy chalkonowej i izomerazy chalkonowej (Chu et al. 2014). Analiza doboru naturalnego przy użyciu modelu miejsc i gałęzi drzewa genowego doprowadziła do zidentyfikowania statystycznie istotnych znaczników selekcji pozytywnej (różnicującej) w obrębie linii *Lupinus*. Na podstawie otrzymanych wyników wyciągnięto wniosek, że ten typ selekcji wystąpił najprawdopodobniej we wczesnej fazie ewolucji linii ewolucyjnej prowadzącej do rodzaju *Lupinus*. Po duplikacji całego genomu nowo powstałe kopie genu *IFS* zostały poddane selekcji oczyszczającej, która powstrzymała dalsze zmiany sekwencji aminokwasowej tych duplikatów. Uzyskane wyniki zamieszczono w recenzowanej publikacji oryginalnej w czasopiśmie z dostępem limitowanym (Plant Science), w której habilitant jest jednym z dwóch pierwszych autorów o równorzędnym udziale i autorem korespondencyjnym **(Narożna et al. 2017)**.

Karboksylaza acetylo-koenzymu A jest jednym z podstawowych enzymów komórkowych, uczestniczących w syntezie kwasów tłuszczowych. Rośliny posiadają dwie wersje tego enzymu, różniące się lokalizacją, pochodzeniem, liczbą genów kodujących, a także funkcją biologiczną samego białka (Sasaki et al. 1995). Karboksylaza acetylo-koenzymu A zlokalizowana w cytozolu pochodzi od wspólnego przodka organizmów eukariotycznych i jest kodowana przez genom jądrowy w postaci jednego genu (*ACC*) składającego się z domen odpowiadających poszczególnym podjednostkom funkcjonalnym (karboksylaza biotyny, białko przenoszące karboksybiotynę, domena centralna i karboksyltransferaza). Forma cytozolowa dostarcza substratów do syntezy długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, fitoaleksyn, flawonoidów i antocyjanów. Karboksylaza zlokalizowana w plastydach pochodzi od sinic (*Cyanobacteria*) i każda podjednostka jest kodowana przez inny gen, a mianowicie alfa-karboksyltransferaza (CT-α) przez gen *accA*, beta-karboksyltransferaza (CT-ß) przez

accD, białko przenoszące karboksybiotynę (BCCP) przez *accB* i karboksylaza biotyny (BC) przez *accC*. Geny *accA*, *accB* i *accC* są zlokalizowane w genomie jądrowym zaś *accD* w genomie plastydowym. Enzym dostarcza substratów do syntezy kwasów tłuszczowych *de novo*.

Geny z genomu jądrowego kodujące oba rodzaje enzymów były analizowane zarówno metodami molekularnymi na drodze hybrydyzacji sond DNA z biblioteką klonów BAC genomu jądrowego łubinu wąskolistnego, jak i analizy niedawno opublikowanych sekwencji genomów 10 gatunków i transkryptomów 15 gatunków roślin z rodziny bobowatych **(Szczepaniak et al. 2018)**. Do hybrydyzacji zastosowano cztery sondy molekularne (jedną dla genu kodującego cytozolową formę enzymu i trzy dla genów kodujących podjednostki formy plastydowej). Do analiz wybrano 27 klonów BAC, które poddano sekwencjonowaniu końców. Sekwencje sond użytych do hybrydyzacji oraz uzyskane sekwencje końców klonów BAC zdeponowano w publicznie dostępnej bazie danych NCBI (**MF378602-MF378605** i **MF346806-MF346859**). Na matrycy uzyskanych sekwencji opracowano 14 polimorficznych markerów molekularnych, które zmapowano w 9 grupach sprzężeń. Nowe markery przypisały do mapy genetycznej 12 klonów BAC wykazujących w doświadczeniach BAC-FISH sygnały typu single locus w chromosomach metafazowych, istotnie uzupełniając zestaw znanych chromosomowo-specyficznych markerów cytogenetycznych łubinu wąskolistnego. Uzyskano sekwencje 11 insertów klonów BAC o następujących długościach: 009A01 (45596 pz), 009K06 (54264 pz), 042E20 (35419 pz), 051F15 (57486 pz), 060F02 (79573 pz), 070D20 (46840 pz), 073E17 (42375 pz), 075C05 (94179 pz), 089L06 (23289 pz), 092K09 (162642 pz), 096G16 (4599 pz). Wykonanie adnotacji funkcjonalnej tych sekwencji doprowadziło do zidentyfikowania trzech regionów bogatych w geny, zawierających około 10-12 genów / 100 kpz przy udziale elementów repetytywnych na poziomie 2,2-16,4%. Regiony te wykazały wysoki stopień kolinearności sekwencji w genomach badanych przedstawicieli *Papilionoideae*. Adnotowane sekwencje klonów BAC zdeponowano w publicznie dostępnej bazie danych NCBI (**MK045264-MK045274**).

W puli badanych 16 gatunków roślin bobowatych najmniejszą liczbę kopii genów kodujących karboksylazy acetylo-koenzymu A (formę cytozolową i/lub podjednostki formy plastydowej) stwierdzono u *Cercis canadensis* i *Copaifera officinalis*, zaś największą u *L. albus*, *G. max*, and *L. angustifolius* (te trzy gatunki zachowały loci zduplikowane dla wszystkich czterech analizowanych genów). Geny *ACC* i *accC* zachowały najmniejszą liczbę duplikacji (średnio 1,5 kopii), natomiast geny *accB* największą (średnio 3,2 kopii). Geny, które uległy duplikacji, zachowały wysokie podobieństwo strukturalne, wyrażone w postaci identycznej liczby eksonów oraz zbliżonego poziomu identyczności do sekwencji białka referencyjnego z *A. thaliana* lub *Chlamydomonas reinhardtii*. Dla wszystkich regionów genomu łubinu wąskolistnego zawierających sekwencje genów karboksylaz acetylo-koenzymu A zidentyfikowano w sekwencjach genomów 9 gatunków roślin bobowatych odpowiadające im regiony o wysokim stopniu kolinearności. Analiza syntenii wykazała wystąpienie liniowo-specyficznych duplikacji regionów kodujących geny *ACC* (*L. angustifolius*, *M. truncatula* i *G. max*), *accA* (*L. angustifolius* i *G. max*), *accB* (*G. max*) oraz *accC* (*L. angustifolius* i *G. max*). Geny *accB* podzielono na dwie główne grupy, *accB1* i *accB2*, przy czym nie zaobserwowano żadnych loci kolinearnych pomiędzy tymi grupami. Grupa *accB1* wyewoluowała na drodze liniowo-specyficznych duplikacji, zaś *accB2* na drodze duplikacji liniowo-specyficznych oraz ancestralnych, obejmujących kilka kladów. Przedstawiciele obu grup występują w genomie *A. thaliana*, więc ich rozdzielenie musiało nastąpić na wcześniejszym etapie ewolucji. Mapowanie się dwóch lub więcej regionów genomu łubinu wąskolistnego do tych samych regionów kolinearnych genomów roślin bobowatych stanowiło przyczynek do wnioskowania o ewolucyjnym pochodzeniu tych kopii na drodze duplikacji całego genomu. Takie obserwacje poczyniono dla następujących genów: *Lan*_ACC1, Lan_*ACC2*; *Lan_accA1*, *Lan_accA2*, *Lan_accA3*; *Lan_accB2a*/*Lan_accB2b*, *Lan_accB2c*; i *Lan_accC1*, *Lan_accC2*. U innych gatunków roślin bobowatych takie podłoże ewolucyjne wykazano dla genów *Gma_ACC1*, *Gma_ACC2*; *Gma_accB1a*, *Gma_accB1b*; *Adu_accB2a*, *Adu_accB2b*; *Aip_accB2a*, *Aip_accB2b*; *Cca_accB2a*, *Cca_accB2b*; *Gma_accB2a*, *Gma_accB2b*, *Gma_aacB2c*; *Lja_accB2a*, *Lja_accB2b*; i *Mtr_accB2*, *Mtr_accB2b*. Duplikacje tandemowe przyczyniły się do powstania genów *Mt_ACC1*,

Mt_ACC2; *Gma_accA1*, *Gma_accA2*, *Gma_accA3*; *Lan_accB2a*, *Lan_accB2b*; *Pvu_accB2a*, *Pvu_accB2b*; i *Vra_accB2a*, *Vra_accB2b*. Sekwencje *Adu_accA2*, *Aip_accA2*, *Adu_accC1* i *Aip_accC1* ewoluowały najprawdopodobniej na drodze duplikacji pojedynczego genu. Ujawniony metodą mapowania porównawczego wzór duplikacji liniowo-specyficznych i ancestralnych potwierdziła również topologia drzewa konsensusowego uzyskanego dla 138 sekwencji genów kodujących formę cytozolową i podjednostki formy plastydowej karboksylazy acetylo-koenzymu A. Wnioskowanie filogenetyczne pozwoliło objąć analizą także 6 gatunków nie uwzględnionych w mapowaniu porównawczym ze względu na brak opublikowanej sekwencji genomu, w tym m.in. łubin biały (*L. albus*). Struktura drzew genowych wykazała, że wszystkie duplikacje genów *ACC*, *accA*, *accB1*, *accB2* i *accC* u badanych gatunków łubinów wystąpiły po oddzieleniu się linii ancestralnej *Lupinus* od głównego pnia ewolucyjnego bobowatych, jednakże sekwencje *ACC*, *accA*, *accB2* i *accC* nie utworzyły monofiletycznych kladów, co sugeruje wystąpienie jednej duplikacji przed rozejściem się linii ewolucyjnych *L. angustifolius* i *L. albus*. W przypadku genu *accB1* nie znaleziono dowodów na wystąpienie takiej duplikacji. Topologia drzew konsensusowych uzyskanych dla wszystkich badanych genów była zgodna z ogólną hipotezą przebiegu ewolucji roślin bobowatych z dwoma wyjątkami mogącymi być pozostałościami dawnych duplikacji. Pierwszy z nich obejmował duplikaty genu *accC* u *Arachis* (*Adu_accC1*/*Aip_accC1*), zaś drugi duplikaty genu *accA* u sześciu gatunków (*Bto_accA2*, *Cof_accA2*, *Cca_accA1*, *Adu_accA2*, *Aip_accA2* i *Lja_accA2*). W obu przypadkach były to „dodatkowe" kopie genów, bowiem w genomach tych gatunków roślin zachowały się także sekwencje z głównego pnia ewolucyjnego. Analiza presji selekcyjnej ujawniła znacznie szybsze tempo ewolucji kladu zawierającego sekwencje *Bto_accA2*, *Cof_accA2*, *Cca_accA1*, *Adu_accA2*, *Aip_accA2* i *Lja_accA2* wyrażone poprzez współczynnik mutacji synonimicznych około 35 krotnie większy niż w przypadku sekwencji z głównego pnia ewolucyjnego. Analiza doboru naturalnego przy użyciu modelu miejsc i gałęzi drzewa genowego ujawniła bardzo silny sygnał doboru różnicującego (FDR q-value 3E-06) w obrębie tego kladu, obejmującego m.in. trzy pozycje aminokwasowe z regionów zachowawczych. Pozostałości selekcji pozytywnej, aczkolwiek słabiej wyrażone, zaobserwowano także u *Arachis* spp. (*accB2*) i *Lupinus* spp. (*accC*, *accB1*).

Na podstawie danych transkryptomicznych wykonano analizę ekspresji genów *in silico* u 8 gatunków roślin bobowatych. Geny kodujące cytozolową formę karboksylazy acetylo-koenzymu A wykazały wysoki poziom ekspresji w korzeniach, młodych liściach oraz strąkach i nasionach podczas ich dojrzewania u większości badanych gatunków. Obserwowany profil ekspresji odzwierciedla znaczne zapotrzebowanie na wydłużanie łańcuchów kwasów tłuszczowych, wykorzystywanych do produkcji wosku kutykularnego odkładanego na powierzchni liści i innych organów w celu ochrony przed utratą wody i wpływem stresów środowiskowych (Lu et al. 2011; Post-Beittenmiller 1996). Ekspresja genów *ACC* w rozwijających się nasionach i strąkach związana jest z procesem embriogenezy, a później z koniecznością utworzenia bariery regulującej gospodarkę wodną nasion (zarówno w zakresie utraty, jak i dopływu wody) (Baud et al. 2003). Stwierdzona u *Arachis* spp. podwyższona ekspresja genu *ACC* w brodawkach korzeniowych może być związana z mechanizmami kontrolującymi funkcjonowanie bakterii symbiotycznych wewnątrz komórek roślinnych (Garcia-Ponce and Rocha-Sosa 2000). Obserwowany wzór ekspresji genów kodujących podjednostki plastydowej formy karboksylazy acetylo-koenzymu A odzwierciedlał zapotrzebowanie na substraty do syntezy fosfolipidów wchodzących w skład błon komórkowych i organelli oraz depozycji kwasów tłuszczowych (Ke et al. 2000; Nikolau et al. 2003; Wan et al. 2016; Wang et al. 2016). Profilowanie ekspresji *in silico* ujawniło odmienny profil ekspresji genów z pobocznego kladu *accA* (*Adu_accA2*, *Aip_accA2*, *Lja_accA2*, *Cca_accA1*) w porównaniu do głównej osi ewolucyjnej, zarówno w kontekście poziomu ekspresji (niższy w kladzie pobocznym) jak i głównych organów (w kladzie pobocznym były to liście, w głównej osi ewolucyjnej - liście, strąki i nasiona). Obserwacje te wskazują na hipotetyczną sub-funkcjonalizację sekwencji z kladu pobocznego *accA*. Zróżnicowanie profilu ekspresji pomiędzy kopiami poszczególnych genów zaobserwowano także dla *accA* u *G. max*, *accC1* u *A. duransensis* oraz pomiędzy *accB1* i *accB2* u większości badanych gatunków. Uzyskane wyniki zamieszczono w

recenzowanej publikacji oryginalnej w czasopiśmie typu open access (Genes), w której habilitant jest drugim autorem i autorem korespondencyjnym **(Szczepaniak et al. 2018)**.

Najważniejsze osiągnięcia poznawcze i aplikacyjne przeprowadzonych badań:

- identyfikacja regionów bogatych w geny w genomie łubinu wąskolistnego wykazujących wysoki stopień kolinearności w obrębie rodziny roślin bobowatych;

- określenie wpływu duplikacji całych genomów roślin bobowatych, w tym także łubinu wąskolistnego, na proces ewolucji wybranych genów ze szlaku syntezy flawonoidów i izoflawonoidów (izomeraza chalkonowa, syntaza izoflawonowa), szlaku indukcji kwitnienia w odpowiedzi na fotoperiod i wernalizację (gen *FLOWERING LOCUS T*) oraz szlaku syntezy kwasów tłuszczowych (karboksylaza acetylo-koenzymu A);

- poznanie wpływu doboru naturalnego (zarówno oczyszczającego jak i różnicującego) na proces ewolucji i ewentualne zróżnicowanie funkcjonalne wybranych genów, które uległy duplikacji

- poznanie genu warunkującego cechę wczesności kwitnienia łubinu wąskolistnego

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

Identyfikacja w genomie łubinu wąskolistnego regionu bogatego w geny zawierającego gen SymRK (Książkiewicz et al. 2009; Mahé et al. 2011)

Jedną z charakterystycznych cech roślin bobowatych jest zdolność do nawiązywania symbiozy diazotroficznej w procesie zwanym nodulacją. Przebieg nodulacji uwarunkowany jest wymianą informacji pomiędzy komponentami symbiotycznymi, która inicjuje kompatybilną odpowiedź u obu organizmów. Jednym z podstawowych genów uczestniczących w tym procesie jest symbiotyczna kinaza receptorowa *SymRK*, która odpowiada za detekcję czynników produkowanych przez symbiotyczne mikroorganizmy i uruchomienie kaskady sygnałów inicjujących nodulację (Endre et al. 2002). Sekwencję genu *SymRK* zastosowano jako sondę molekularną do hybrydyzacji z biblioteką klonów BAC genomu jądrowego łubinu wąskolistnego. Wyselekcjonowano 5 klonów BAC, które metodą fingerprintingu restrykcyjnego zgrupowano w jeden kontig **(Książkiewicz et al. 2009)**. Biorąc pod uwagę średnie pokrycie genomu w bibliotece, szacowane na 6× (Kasprzak et al. 2006), liczba zidentyfikowanych klonów BAC odpowiada jednej kopii sekwencji *SymRK*. Na podstawie struktury kontigu wybrano jeden klon do sekwencjonowania insertu. Adnotacja funkcjonalna sekwencji klonu 107P17 (116 kpz) wykazała, gen *SymRK* znajduje się w regionie bogatym w geny, otoczonym przez dwa regiony zawierające elementy repetytywne *copia* i *gypsy*. Analiza substytucji nukleotydowych wykazała, że gen *SymRK* znajdował się pod działaniem silnego doboru oczyszczającego, co jest zrozumiałe w kontekście rangi pełnionej funkcji biologicznej i faktu występowania w jednej kopii. Mapowanie porównawcze sekwencji klonu 107P17 do sekwencji *G. max*, *M. truncatula* i *L. japonicus* ujawniło wysoki stopień kolinearności loci w obrębie regionu zawierającego gen *SymRK*. Gen *SymRK*, występujący u bobowatych przeważnie w pojedynczej kopii, został uznany na podstawie wnioskowania filogenetycznego za cenny marker wspomagający analizy ewolucyjne **(Mahé et al. 2011)**.

Integracja mapy genetycznej z chromosomami łubinu wąskolistnego (Leśniewska et al. 2011; Naganowska et al. 2011; Wyrwa et al. 2016)

Opracowanie mapy genetycznej zawierającej markery sekwencyjnie zdefiniowane **(Nelson et al. 2006)** oraz skonstruowanie biblioteki klonów BAC zawierającej DNA genomu jądrowego (Kasprzak et

al. 2006) umożliwiło podjęcie prac ukierunkowanych na przypisanie poszczególnych grup sprzężeń łubinu wąskolistnego do odpowiadających im chromosomów metodami cytogenetycznymi przy użyciu sond molekularnych. Rozważane były dwa podejścia - lokalizacja w chromosomach krótkich sekwencji metodą PRINS (primed *in situ* DNA labeling) lub C-PRINS (cycling PRINS) oraz fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* długich sond molekularnych, np. klonów BAC (BAC-FISH) (Kaczmarek et al. 2007; Kaczmarek et al. 2009). Jako docelowa została wybrana metoda BAC-FISH ze względu na wysoką powtarzalność wyników i możliwość używania takich klonów także w analizach międzygatunkowych. Wstępne prace wykazały, że tylko relatywnie niewielki odsetek klonów hybrydyzuje specyficznie generując w chromosomach mitotycznych łubinu wąskolistnego w stadium metafazy sygnały single locus, zaś zdecydowana większość klonów wybranych losowo z biblioteki BAC generuje sygnały repetytywne, rozproszone na wielu chromosomach. Integrację mapy prowadzono więc stopniowo, w miarę uzyskiwania w toku równolegle trwających prac klonów BAC generujących sygnały single locus **(Książkiewicz et al. 2008; Książkiewicz et al. 2009; Książkiewicz et al. 2016; Książkiewicz et al. 2013; Książkiewicz et al. 2015; Mahé et al. 2011; Przysiecka et al. 2015; Wolko et al. 2008; Wolko et al. 2010)**. Klony BAC były przypisywane do grup sprzężeń przy pomocy markerów genetycznych, zaprojektowanych na matrycy sekwencji końców klonów. Wyniki mapowania genetycznego i fizycznego (konstrukcji kontigów) weryfikowane były poprzez analizy cytogenetyczne z użyciem dwóch odmiennie wyznakowanych sond molekularnych reprezentujących różne klony BAC **(Leśniewska et al. 2011; Naganowska et al. 2011)**. Te prace doprowadziły ostatecznie do uzyskania zintegrowanej mapy genomu łubinu wąskolistnego, zawierającej 73 chromosomowo-specyficzne markery molekularne (71 klonów BAC oraz amplifikowane metodą PCR sekwencje 5S rDNA i podjednostki 25S rDNA). Zintegrowana mapa genetyczna dostarczyła nowych dowodów na duplikacje całego genomu łubinu wąskolistnego, a także innych gatunków roślin bobowatych. Adnotacja sekwencji klonów wykazujących sygnały BAC-FISH w regionach centromerowych i pericentromerowych doprowadziła do określenia loci SSR zlokalizowanych w tych regionach („AGG" i „GATAC") i uzyskania krótkich sond oligonukleotydowych do znakowania okolic centromerów **(Wyrwa et al. 2016)**. Zintegrowana mapa genetyczna używana była w międzygatunkowych analizach porównawczych w obrębie rodzaju *Lupinus*, zaś opracowany zestaw klonów BAC, pełniących funkcję heterologicznych chromosomowo-specyficznych sond molekularnych, okazał się przydatnym narzędziem do śledzenia rearanżacji chromosomach w innych gatunkach łubinów (Susek et al. 2019; Susek et al. 2016).

Identyfikacja mutacji odpowiedzialnej za wczesność kwitnienia łubinu wąskolistnego (Nelson et al. 2017)

Jedną z głównych cech użytkowych łubinu wąskolistnego jest termoneutralność, polegająca na zniesieniu wymagań wernalizacyjnych. Cecha ta pojawiła się jako spontaniczna mutacja w procesie hodowlanym. W pracach australijskich zidentyfikowano locus *Ku*, zaś w europejskich *Julius*. W cyklu publikacji składających się na habilitacyjne osiągnięcie naukowe zawarto pracę opisującą wyniki analiz z zakresu genomiki strukturalnej i wnioskowania filogenetycznego obejmujących regiony genomu łubinu wąskolistnego zawierające geny z rodziny PEBP, w tym kandydujący gen warunkujący cechę wczesności kwitnienia (*LanFTc1*) (Książkiewicz et al. 2016). W ramach naukowej współpracy międzynarodowej prowadzono dalsze badania genu *LanFTc1*. Prace doprowadziły do identyfikacji mutacji odpowiedzialnej na zniesienie wymagań wernalizacyjnych, polegającej na delecji odcinka o długości 1,4 kpz w regionie promotorowym tego genu. W sekwencji delecji zidentyfikowano potencjalne miejsca wiązania znacznej liczby czynników transkrypcyjnych, w tym także głównych regulatorów indukcji kwitnienia: *SEPALLATA 3* (*SEP3*), *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*), *SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* (*SPL*) i in. Zaprojektowany został marker molekularny polimorfizmu długości produktu PCR, zawierający w sobie sekwencję delecji. Genotypowanie tym markerem zestawu 166 dzikich linii łubinu wąskolistnego i 48 linii udomowionych wykazało 100% korelację polimorfizmu markera z cechą wczesności kwitnienia. W linii dzikiej P27255 wykazano silną odpowiedź transkrypcyjną genu *LanFTc1* na wernalizację: 3600

krotny wzrost poziomu ekspresji w merystemie wierzchołkowym i 74000 krotny wzrost poziomu ekspresji w liściach. W linii udomowionej 83A:476 poziom ekspresji *LanFTc1* w obu wariantach doświadczenia był porównywalny z poziomem ekspresji w linii dzikiej wernalizowanej. Tego typu obserwacje wskazują, że istotą termoneutralności łubinu wąskolistnego jest zniesienie represji w regionie regulatorowym genu *LanFTc1*, skutkujące uruchomieniem ekspresji tego genu na wysokim poziomie i na wczesnych etapach rozwoju rośliny. Łubin wąskolistny jest pierwszym znanym gatunkiem, u którego odpowiedź na wernalizację regulowana jest przez gen z kladu *FTc*. Dla porównania, u *M. truncatula* odpowiedź na wernalizację warunkuje gen *FTa*, zaś gen *FTb* (czyli z kladu, który nie występuje u łubinu wąskolistnego) uczestniczy w szlaku fotoperiodycznym (Hecht et al. 2011; Laurie et al. 2011). Z kolei u *G. max*, która nie wymaga wernalizacji do indukcji kwitnienia, geny *FTa* i *FTc* kontrolują odpowiedź fotoperiodyczną (Hecht et al. 2011; Kong et al. 2010; Laurie et al. 2011; Takeshima et al. 2016). U grochu genem wczesności kwitnienia z locus *GIGAS* jest homolog *FTa* (Hecht et al. 2011). W pracy podsumowującej uzyskane wyniki habilitant jest jednym z trzech pierwszych autorów o równorzędnym udziale **(Nelson et al. 2017)**. Dalsze prace zespołu australijskiego wykazały, że w kolekcji światowej łubinu wąskolistnego występują także dwa inne warianty delecji w regionie promotorowym genu *LanFTc1* (nakładające się z delecją odpowiadającą za locus *Ku*), z których jeden odpowiada za locus *Julius*, zaś drugi za wczesność kwitnienia linii z okolic Izraela i Palestyny (Taylor et al. 2019). Linie kolekcyjne wykazujące różną długość delecji regionu regulatorowego genu *LanFTc1* i związane z tym różne wymagania wernalizacyjne stanowią cenny materiał do dalszych prac z zakresu genomiki funkcjonalnej, tranksryptomiki i proteomiki.

Konstrukcja konsensusowej mapy genetycznej łubinu białego i określenie loci czterech cech o istotnym znaczeniu rolniczym: wczesności kwitnienia, niskiej zawartości alkaloidów i odporności na dwie choroby grzybowe: antraknozę i brunatną plamistość łodyg (Książkiewicz et al. 2017).

W ramach współpracy międzynarodowej z Department of Agriculture and Food Western Australia w 2013 roku uzyskano dostęp do nasion linii rekombinantów wsobnych populacji mapującej łubinu białego. Populacja uzyskana została metodą pojedynczych nasion z krzyżówki linii dzikiej z Etiopii (P27174) i linii udomowionej z Ukrainy (Kiev Mutant). Linia udomowiona jest donorem genów wczesności kwitnienia i niskiej zawartości alkaloidów, zaś linia dzika - odporności na antraknozę i brunatną plamistość łodyg. We współpracy z CRA FLC - Centro di Ricerca per le Produzioni Foraggere e Lattiero Casearie (Lodi, Włochy) wykonano genotypowanie przez sekwencjonowanie 189 linii wsobnych. Uzyskany zestaw 3597 markerów polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) oraz 465 markerów z dwóch poprzednich map poddano procesowi mapowania genetycznego. Skonstruowano 25 grup sprzężeń odpowiadających 25 parom chromosomów w genomie łubinu białego. Wszystkie grupy sprzężeń z poprzednich dwóch map tego gatunku (Phan et al. 2007; Vipin et al. 2013) zostały włączone do nowej mapy. Utworzona mapa stanowiła platformę do mapowania loci cech ilościowych, takich jak wczesność kwitnienia i odporność na antraknozę. W wyniku kompozytowego genomowego mapowania interwałowego określono loci cech ilościowych wczesności kwitnienia (4 główne loci wyjaśniające łącznie ponad 65% wariancji fenotypowej) i odporności na antraknozę (2 główne loci wyjaśniające ponad 50% obserwowanej zmienności). Zlokalizowano też locus niskiej zawartości alkaloidów. Dla każdego z loci wygenerowano sekwencyjnie zdefiniowane markery molekularne do rutynowego testowania genotypów metodą amplifikacji PCR i trawienia enzymatycznego. Markery te potwierdzono przez amplifikację i sekwencjonowanie produktów PCR. Sekwencje markerów zdeponowano w banku genów pod numerami **MF630883-MF630916**. Opracowana mapa była również wykorzystywana do międzygatunkowego mapowania porównawczego (m.in. do sekwencji genomu łubinu wąskolistnego) i identyfikacji regionów syntenicznych. Oprócz konstrukcji mapy konsensusowej i identyfikacji loci cech użytkowych łubinu białego istotnym osiągnięciem było wykazanie innego podłoża genetycznego cechy wczesności kwitnienia i odporności na antraknozę (w porównaniu do łubinu wąskolistnego), polegającego na innym wzorcu dziedziczenia (recesywny vs dominacyjny), różnej liczbie genów warunkujących cechę (cecha wielogenowa vs cecha jednogenowa) i innym podłożu molekularnym (loci cech ilościowych

zlokalizowane były w regionach mapy sprzężeń łubinu białego kolinearnych do regionów genomu łubinu wąskolistnego nie zawierających loci genów wczesności kwitnienia i odporności na antraknozę tego gatunku). Uzyskane wyniki zamieszczono w recenzowanej publikacji oryginalnej w czasopiśmie typu open access (Scientific Reports), w której habilitant jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym **(Książkiewicz et al. 2017)**.

Identyfikacja genów kandydujących warunkujących wczesność kwitnienia łubinu białego (Rychel et al. 2019).

Utworzona konsensusowa mapa genetyczna łubinu białego zawierająca loci cech ilościowych i sekwencyjnie zdefiniowane markery genetyczne **(Książkiewicz et al. 2017)** stanowiła podstawę do dalszych prac badawczych ukierunkowanych na poznanie molekularnego podłoża wczesności kwitnienia u tego gatunku. Na podstawie danych literaturowych wybrano zestaw sekwencji homologów znanych genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia (58 sekwencji *A. thaliana*, 13 *G. max* i 9 *L. angustifolius*). Sekwencje te przyrównano do sekwencji transkryptomu linii rodzicielskich populacji mapującej łubinu białego, co pozwoliło na wybranie 36 genów do dalszych analiz. Na matrycy DNA tych sekwencji opracowano 6 markerów polimorfizmu długości produktu PCR, 22 markery CAPS i 5 markerów dCAPS. Sekwencje markerów zdeponowano w publicznie dostępnej bazie danych DDBJ (**LC434127-LC434318**). Markery rozlokowano w 17 grupach sprzężeń przy wysokich wartościach LOD (32,4-58,7) potwierdzających sprzężenie. Uaktualnioną mapę genetyczną wykorzystano do ponownego mapowania loci ilościowych cechy wczesności kwitnienia. Loci te zlokalizowano w grupach sprzężeń ALB02 w pozycjach 2.2 cM i 100.2/100.5 cM, ALB13 w pozycji 96.2/99.3 cM, ALB16 w pozycji 0.9/2.2 cM I ALB24 w pozycji 0.0/2.1 cM. Trzyloci (ALB02-2.2 cM, ALB02-100.2/100.5 cM i ALB13-96.2/99.3 cM) wykazały absolutną ko-lokalizację z markerami homologów genów wczesności kwitnienia, a mianowicie GI-F1 (gen *GIGANTEA*), FTa1-F1/FTa1-F2 (gen *FLOWERING LOCUS T*) i SEP3-F1 (gen *SEPALLATA 3*), zaś locus ALB16-0.9/2.2 cM sąsiadował z markerem FRI31-F1 (gen *FRIGIDA 3*). Uzyskany wynik stanowił przesłankę do wytypowania sekwencji *GIGANTEA*, *FLOWERING LOCUS T*, *SEPALLATA 3* and *FRIGIDA 3* jako kandydujących genów warunkujących cechę wczesności kwitnienia. Adnotacja sekwencji regionów genomu łubinu wąskolistnego kolinearnych do segmentów mapy genetycznej łubinu białego zawierających te loci wykazała, że zawierają one sekwencje homologiczne do ww. genów. Ponadto, w regionie genomu łubinu wąskolistnego kolinearnym do segmentu mapy genetycznej zawierającego marker SEP3-F1 adnotowano region bogaty w geny, zwierający szereg innych potencjalnych regulatorów indukcji kwitnienia: *FLOWERING PROMOTING FACTOR 1 (FPF1)* (Lup018401), *AGAMOUS-like 65* (*AGL65*) (Lup018444), *SQUAMOSA* (SQA, Lup018483), *SEP4* (Lup018484) i *AGL8* (Lup018485). W przypadku markerów GI-F1, FTa1-F1/FTa1-F2 i FRI31-F1 nie zidentyfikowano w regionach kolinearnych żadnych blisko zlokalizowanych innych potencjalnych genów mogących uczestniczyć w regulacji indukcji kwitnienia. Uzyskane wyniki zawarte zostały w publikacji, w której habilitant jest autorem korespondencyjnym oraz jednym z dwóch pierwszych autorów o równorzędnym udziale **(Rychel et al. 2019)**.

Projekty badawcze

Habilitant był kierownikiem bądź głównym wykonawcą w trzech projektach: w projekcie promotorskim finansowanym ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, w projekcie badawczym finansowanym ze środków Postępu Biologicznego w Produkcji Roślinnej Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi oraz w projekcie Sonata 9 finansowanym ze środków Narodowego Centrum Nauki. Ponadto, habilitant był wykonawcą w dwóch projektach międzynarodowych finansowanych ze środków Unii Europejskiej oraz dziewięciu projektach krajowych finansowanych ze środków: Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (3 projekty), Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi (3 projekty), Narodowego Centrum Nauki (2 projekty) i Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (1 projekt). Spis projektów wraz z tytułami i okresem realizacji przedstawiono w załączniku nr 3a.

Współpraca naukowa

Habilitant prowadził badania we współpracy naukowej z ośrodkami z kraju, jak i z zagranicy. Współpraca ta była wykonywana w ramach projektów badawczych, wymiany materiałów roślinnych i wybranych wyników badań oraz przygotowywania publikacji. Ze współpracujących bezpośrednio z habilitantem naukowców z ośrodków zagranicznych na szczególną uwagę zasługują kontakty zakończone wymiernym efektem w postaci wspólnych publikacji:

- dr Hua'an Yang z Department of Agriculture and Food Western Australia (Perth, Australia): wymiana materiałów roślinnych i wybranych wyników badań, krótkoterminowy staż naukowy habilitanta, wspólne doniesienia konferencyjne i publikacje **(Książkiewicz et al. 2008; Książkiewicz et al. 2017)**
- dr Matthew Nelson z Kew Gardens (Ardingly UK) i University of Western Australia (Perth, Australia): wymiana materiałów roślinnych, wspólne prowadzenie badań, współpraca w ramach projektów finansowanych ze środków Narodowego Centrum Nauki oraz Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi, wspólne doniesienia konferencyjne i publikacje **(Książkiewicz et al. 2017; Książkiewicz et al. 2016; Leśniewska et al. 2011; Nelson et al. 2017; Nelson et al. 2006)**
- prof. Paolo Annicchiarico i dr Nelson Nazzicari z Centro di Ricerca per le Produzioni Foraggere e Lattiero Casearie (Lodi, Włochy): wspólne prowadzenie badań, krótkoterminowy staż naukowy habilitanta, współpraca w ramach międzynarodowego projektu badawczego finansowanego ze środków Unii Europejskiej „LEGATO", wspólne doniesienia konferencyjne i publikacja **(Książkiewicz et al. 2017)**
- prof. Abdelkader Ainouche z UMR CNRS Ecobiom Université de Rennes 1 (Rennes, Francja): wspólne prowadzenie badań, krótkoterminowy staż naukowy habilitanta, wspólne doniesienia konferencyjne i publikacje **(Książkiewicz et al. 2009; Leśniewska et al. 2011; Mahé et al. 2011)**

Współpraca krajowa prowadzona była w ramach projektów badawczych i przygotowywania publikacji. Obejmowała ona m.in. następujące osoby i ośrodki badawcze:

- prof. dr hab. Marek Figlerowicz i dr Jan Podkowiński z Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu (Zakład Biologii Molekularnej i Systemowej): współpraca w ramach projektów finansowanych ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Narodowego Centrum Nauki, wspólne doniesienia konferencyjne i publikacje **(Szczepaniak et al. 2018; Wyrwa et al. 2016)**
- prof. dr hab. Wojciech Karłowski i dr Andrzej Zieleziński z Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (Zakład Biologii Obliczeniowej): współpraca w ramach projektów finansowanych ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Narodowego Centrum Nauki, wspólne doniesienia konferencyjne i publikacje **(Książkiewicz et al. 2008; Książkiewicz et al. 2013; Książkiewicz et al. 2015; Zielezinski et al. 2012)**
- prof. dr hab. Cezary Mądrzak i dr hab. Dorota Narożna z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu (Zakład Biologii Molekularnej): współpraca w ramach projektów finansowanych ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Narodowego Centrum Nauki oraz Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, wspólna publikacja **(Narożna et al. 2017)**
- prof. dr hab. inż. Renata Galek i dr inż. Bartosz Kozak z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa): współpraca w ramach projektu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, wspólne doniesienia konferencyjne i w przygotowaniu wspólna publikacja
- dr Stanisław Stawiński z Hodowli Roślin Smolice (Oddział Przebędowo): wymiana materiału roślinnego, współpraca w ramach projektów finansowanych ze środków Ministerstwa Rolnictwa

i Rozwoju Wsi oraz Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, wspólne doniesienia konferencyjne i publikacja **(Książkiewicz et al. 2017)**

- mgr Paweł Barzyk z Poznańskiej Hodowli Roślin Smolice: wymiana materiału roślinnego, współpraca w ramach projektów finansowanych ze środków Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi oraz Narodowego Centrum Badań i Rozwoju.

Doniesienia konferencyjne

Habilitant wygłosił osobiście 4 referaty na konferencja międzynarodowych i 8 referatów na konferencjach krajowych, był też współautorem 7 referatów na konferencjach międzynarodowych i 4 referatów na konferencjach krajowych wygłoszonych przez inne osoby. Ponadto habilitant prezentował wyniki w postaci 22 plakatów na konferencjach międzynarodowych i 15 na konferencjach krajowych. Szczegółowe zestawienie wykładów i posterów wraz danymi bibliometrycznymi przedstawiono w załączniku nr 3a.

Udział w komitetach organizacyjnych konferencji naukowych

Habilitant był członkiem komitetu organizacyjnego dwóch konferencji: 13th International Lupin Conference "Lupin crops – an opportunity for today, a promise for the future" zorganizowanej w Poznaniu w dniach 6-10.06.2011 roku oraz X Ogólnopolskiej Konferencji Polskiego Towarzystwa Łubinowego i II Ogólnopolskiej Konferencji Roślin Strączkowych „Strategie wykorzystania roślin strączkowych" zorganizowanej w Zakopanem w dniach 29.05-01.06.2012.

Udział w konsorcjach badawczych i członkostwo w towarzystwach naukowych

Habilitant uczestniczył w trzech konsorcjach badawczych (na zasadzie udziału w projekcie), w tym dwóch międzynarodowych: transPLANT, „Trans-national infrastructure for plant genomic science" (okres trwania: 01.09.2011-31.08.2015, 11 konsorcjantów) i LEGATO, „LEGumes for the Agriculture of TOmorrow" (okres trwania: 01.01.2014-31.12.2017, 29 konsorcjantów) oraz jednym krajowym: SEGENMAS, „Sekwencjonowanie nowej generacji i mapowanie asocjacyjne jako metody generowania markerów molekularnych cech użytkowych łubinu wąskolistnego" (okres trwania: 1.01.2015-31.12.2017, 7 konsorcjantów).

Habilitant jest członkiem dwóch międzynarodowych i dwóch krajowych towarzystw naukowych: International Lupin Association (od 2008 roku), International Legume Society (od 2016 roku), Polskiego Towarzystwa Genetycznego (od 2010 roku) i Polskiego Towarzystwa Łubinowego (od 2012 roku).

Osiągnięcia dydaktyczne i opieka naukowa

Habilitant wygłosił 5 wykładów dla studentów przedstawiając zagadnienia z genomiki strukturalnej łubinów a także 2 ogólnodostępne wykłady w ramach seminariów naukowych Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. W latach 2011-2017 opiekował się uczestnikami praktyk zawodowych studentów z Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (3 osoby), Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu (2 osoby) i Politechniki Poznańskiej (1 osoba).

Habilitant był promotorem pomocniczym w ramach dwóch przewodów doktorskich: dr Katarzyny Wyrwy (okres sprawowania opieki: 2010-2015, tytuł rozprawy doktorskiej: „Analiza genetyczno-molekularna wybranych genów uczestniczących w wiązaniu azotu atmosferycznego u łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.)", data uzyskania stopnia doktora: 30.09.2015) oraz dr Sandry

Rychel (okres sprawowania opieki: 2012-2018, tytuł rozprawy doktorskiej: „Charakterystyka genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia u łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.) i łubinu białego (*L. albus* L.)", data uzyskania stopnia doktora: 27.02.2018). Aktualnie habilitant jest opiekunem naukowym mgr Piotra Plewińskiego wykonującego pracę doktorską (tematyka dotyczy molekularnych podstaw wczesności kwitnienia łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.), okres sprawowania opieki: od 2016 roku).

Nagrody

Habilitant za działalność naukową otrzymywał nagrody i wyróżnienia krajowe oraz międzynarodowe:

- Wyróżnienie Wydziału II Nauk Biologicznych i Rolniczych PAN za cykl prac pt. „Konstrukcja konsensusowych map genetycznych łubinu wąskolistnego i białego, określenie w genomach tych gatunków regionów konserwatywnych w obrębie roślin strączkowych oraz identyfikacja genów warunkujących cechę wczesności kwitnienia" (2018);
- Nagroda Polskiego Towarzystwa Genetycznego za najlepsze, oryginalne prace z zakresu genetyki wykonane w polskich laboratoriach - specjalność genetyka roślin (2016);
- Krajowa Nagroda Naukowa z zakresu genetyki roślin. im. Stefana Barbackiego - Pierwszego Stopnia za osiągniecia z zakresu genomiki porównawczej roślin strączkowych (2014);
- Wyróżnienie (nagroda) Rady Naukowej Instytutu Genetyki Roślin PAN za pracę doktorską (2010).
- Stypendium Prezesa Polskiej Akademii Nauk (2004-2007);
- Pierwsza Nagroda i Nagroda Specjalna Królewskiego Towarzystwa Geograficznego za pracę "Estimation of urban air pollution using epiphytic lichens" - 11th European Union Contest for Young Scientists, Thessaloniki, Grecja (1999).

Pełnienie funkcji recenzenta

Habilitant był recenzentem w ośmiu czasopismach o zasięgu międzynarodowym, posiadających określony współczynnik wpływu Impact Factor (IF) wg bazy Journal Citation Reports (JCR) Clarivate Analytics: Plant Biotechnology Journal (IF 6.305), BMC Genomics (IF 4.257), International Journal of Molecular Sciences (IF 3.878), BMC Genetics (IF 2.707), Journal of Applied Genetics (IF 1.925), Plant Breeding (IF 1.648), Molecular Cytogenetics (IF 1.545) i Acta Societatis Botanicorum Poloniae (IF 1.321).

Zestawienie podstawowych mierników publikacyjnych

Dorobek publikacyjny	Liczba prac (w tym z listy JCR)	Liczba cytowań wg Web of Science	Suma IF wg JCR	Suma punktów MNiSW
Przed uzyskaniem stopnia doktora	6 (1)	23	3.709	68
Po uzyskaniu stopnia doktora	15 (11)	138	42.423	423
Publikacje w ramach osiągnięcia	6 (6)	43	22.328	220

Piśmiennictwo

Anglade J, Billen G, Garnier J (2015) Relationships for estimating N2 fixation in legumes: incidence for N balance of legume-based cropping systems in Europe Ecosphere 6:1-24 doi:10.1890/ES14-00353.1

Armstead I et al. (2007) Cross-species identification of Mendel's I locus Science 315:73 doi:10.1126/science.1132912

Baud S et al. (2003) Multifunctional acetyl-CoA carboxylase 1 is essential for very long chain fatty acid elongation and embryo development in *Arabidopsis* Plant J 33:75-86 doi:10.1046/j.1365-313X.2003.016010.x

Belarmino LC, da S Oliveira AR, Brasileiro-Vidal AC, de A Bortoleti KC, Bezerra-Neto JP, Abdelnoor RV, Benko-Iseppon AM (2012) Mining plant genome browsers as a means for efficient connection of physical, genetic and cytogenetic mapping: An example using soybean Genet Mol Biol 35:335-347 doi:10.1590/S1415-47572012000200015

Bertioli DJ et al. (2009) An analysis of synteny of *Arachis* with *Lotus* and *Medicago* sheds new light on the structure, stability and evolution of legume genomes BMC Genomics 10:45 doi:10.1186/1471-2164-10-45

Blanc G, Wolfe KH (2004) Functional divergence of duplicated genes formed by polyploidy during *Arabidopsis* evolution Plant Cell 16:1679-1691 doi:10.1105/tpc.021410

Boersma JG, Buirchell BJ, Sivasithamparam K, Yang H (2007a) Development of a PCR marker tightly linked to mollis, the gene that controls seed dormancy in *Lupinus angustifolius* L. Plant Breeding 126:612-616 doi:10.1111/j.1439-0523.2007.01417.x

Boersma JG, Buirchell BJ, Sivasithamparam K, Yang H (2007b) Development of a sequence-specific PCR marker linked to the *Ku* gene which removes the vernalization requirement in narrow-leafed lupin Plant Breeding 126:306–309 doi:10.1111/j.1439-0523.2007.01347.x

Boersma JG, Buirchell BJ, Sivasithamparam K, Yang H (2007c) Development of two sequence-specific PCR markers linked to the le gene that reduces pod shattering in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) Genet Mol Biol 30:623-629 doi:10.1590/S1415-47572007000400020

Boersma JG, Nelson MN, Sivasithamparam K, Yang Ha (2009) Development of sequence-specific PCR markers linked to the Tardus gene that reduces pod shattering in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) Mol Breed 23:259-267 doi:10.1007/s11032-008-9230-2

Boersma JG, Pallotta M, Li C, Buirchell BJ, Sivasithamparam K, Yang H (2005) Construction of a genetic linkage map using MFLP and identification of molecular markers linked to domestication genes in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) Cell Mol Biol Lett 10:331-344

Brien SJ, Cowling WA, Potter RH, Jones RAC, Jones MGK (1999) A molecular marker for early maturity (Ku) and marker-assisted breeding of *Lupinus angustifolius*. In: van Santen E, Wink M, Weissmann S, Roemer P (eds) 9th International Lupin Conference, Klink/Müritz, Germany, 1999. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand, pp 115-117

Cannon SB, Ilut D, Farmer AD, Maki SL, May GD, Singer SR, Doyle JJ (2010) Polyploidy did not predate the evolution of nodulation in all legumes PloS one 5:e11630 doi:10.1371/journal.pone.0011630

Cannon SB et al. (2015) Multiple polyploidy events in the early radiation of nodulating and nonnodulating legumes Mol Biol Evol 32:193-210 doi:10.1093/molbev/msu296

Cannon SB, Sterck L, Rombauts S, Sato S, Cheung F, Gouzy J (2006) Legume genome evolution viewed through the *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* genomes Proc Natl Acad Sci U S A 103 doi:10.1073/pnas.0603228103

Cesco S, Neumann G, Tomasi N, Pinton R, Weisskopf L (2010) Release of plant-borne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition Plant Soil 329:1-25 doi:10.1007/s11104-009-0266-9

Choi HK et al. (2004) A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa* Genetics 166:1463-1502

Chu S, Wang J, Cheng H, Yang Q, Yu D (2014) Evolutionary study of the isoflavonoid pathway based on multiple copies analysis in soybean BMC Genet 15:76 doi:10.1186/1471-2156-15-76

Cork JM, Purugganan MD (2004) The evolution of molecular genetic pathways and networks Bioessays 26:479-484 doi:10.1002/bies.20026

Cusack BP, Wolfe KH (2007) When gene marriages don't work out: divorce by subfunctionalization Trends Genet 23:270-272 doi:10.1016/j.tig.2007.03.010

Dastmalchi M, Dhaubhadel S (2015) Soybean chalcone isomerase: evolution of the fold, and the differential expression and localization of the gene family Planta 241:507-523 doi:10.1007/s00425-014-2200-5

Dhaubhadel S, McGarvey BD, Williams R, Gijzen M (2003) Isoflavonoid biosynthesis and accumulation in developing soybean seeds Plant Mol Biol 53:733-743 doi:10.1023/B:PLAN.0000023666.30358.ae

Dixon RA, Ferreira D (2002) Genistein Phytochemistry 60:205-211

Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Mihacea S, Kaló P, Kiss GB (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development Nature 417:962-966 doi:10.1038/nature00842

Fan C et al. (2014) Conserved *CO-FT* regulons contribute to the photoperiod flowering control in soybean BMC Plant Biol 14:9 doi:10.1186/1471-2229-14-9

Fischer K et al. (2015) Characterization and mapping of *LanrBo*: a locus conferring anthracnose resistance in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) Theor Appl Genet 128:2121-2130 doi:10.1007/s00122-015-2572-3

Forbes I, Wells HD (1968) Hard and soft seededness in blue lupine, *Lupinus angustifolius* L.: inheritance and phenotype classification Crop Sci 8:195-197 doi:10.2135/cropsci1968.0011183X000800020018x

Gao L-L, Hane JK, Kamphuis LG, Foley R, Shi B-J, Atkins CA, Singh KB (2011) Development of genomic resources for the narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius*): construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library and BAC-end sequencing BMC Genomics 12:521 doi:10.1186/1471-2164-12-521

Garcia-Ponce B, Rocha-Sosa M (2000) The octadecanoid pathway is required for pathogen-induced multi-functional acetyl-CoA carboxylase accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Plant Sci 157:181-190 doi:10.1016/S0168-9452(00)00285-5

Gladstones J (1967) Selection for economic characters in *Lupinus angustifolius* and *L. digitatus* Aust J Exp Agric 7:360-366 doi:dx.doi.org/10.1071/EA9670360

Gladstones J, Hill G (1969) Selection for economic characters in *Lupinus angustifolius* and *L. digitatus*. 2. Time of flowering Aust J Exp Agric 9:213-220 doi:10.1071/EA9690213

Graham PH, Vance CP (2003) Legumes: importance and constraints to greater use Plant Physiol 131:872-877 doi:10.1104/pp.017004

Gutierrez-Gonzalez JJ et al. (2010) Differential expression of isoflavone biosynthetic genes in soybean during water deficits Plant Cell Physiol 51:936-948 doi:10.1093/pcp/pcq065

Hackbarth J, Troll HJ (1956) Die Lupinen als Körnerleguminosen und Futterpflanzen. In: Handbuch der Pflanzenzüchtung. Verlag Paul Parey, Berlin, pp 1-51

Hecht V et al. (2011) The pea *GIGAS* gene is a *FLOWERING LOCUS T* homolog necessary for graft-transmissible specification of flowering but not for responsiveness to photoperiod Plant Cell 23:147-161 doi:10.1105/tpc.110.081042

Hedman H, Kallman T, Lagercrantz U (2009) Early evolution of the *MFT*-like gene family in plants Plant Mol Biol 70:359-369 doi:10.1007/s11103-009-9478-x

Hougaard BK et al. (2008) Legume anchor markers link syntenic regions between *Phaseolus vulgaris*, *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula* and *Arachis* Genetics 179:2299-2312 doi:10.1534/genetics.108.090084

Hughes C, Eastwood R (2006) Island radiation on a continental scale: exceptional rates of plant diversification after uplift of the Andes Proc Natl Acad Sci USA 103:10334-10339 doi:10.1073/pnas.0601928103

Kaczmarek A, Naganowska B, Wolko B (2007) PRINS and C-PRINS: promising tools for the physical mapping of the lupin genome Cell Mol Biol Lett 12:16-24 doi:10.2478/s11658-006-0056-9

Kaczmarek A, Naganowska B, Wolko B (2009) Karyotyping of the narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) by using FISH, PRINS and computer measurements of chromosomes J Appl Genet 50:77-82 doi:10.1007/BF03195657

Karlgren A, Gyllenstrand N, Kallman T, Sundstrom JF, Moore D, Lascoux M, Lagercrantz U (2011) Evolution of the PEBP gene family in plants: functional diversification in seed plant evolution Plant Physiol 156:1967-1977 doi:10.1104/pp.111.176206

Kasprzak A, Safár J, Janda J, Dolezel J, Wolko B, Naganowska B (2006) The bacterial artificial chromosome (BAC) library of the narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) Cell Mol Biol Lett 11:396-407 doi:10.2478/s11658-006-0033-3

Ke J, Wen TN, Nikolau BJ, Wurtele ES (2000) Coordinate regulation of the nuclear and plastidic genes coding for the subunits of the heteromeric acetyl-coenzyme A carboxylase Plant Physiol 122:1057-1071 doi:10.1104/pp.122.4.1057

Kim DH, Hwang I (2013) Direct targeting of proteins from the cytosol to organelles: the ER versus endosymbiotic organelles Traffic (Copenhagen, Denmark) 14:613-621 doi:10.1111/tra.12043

Kong F et al. (2010) Two coordinately regulated homologs of *FLOWERING LOCUS T* are involved in the control of photoperiodic flowering in soybean Plant Physiol 154:1220-1231 doi:10.1104/pp.110.160796

Konieczny A, Ausubel FM (1993) A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers Plant J 4:403-410 doi:10.1046/j.1365-313X.1993.04020403.x

Kosslak RM, Bookland R, Barkei J, Paaren HE, Appelbaum ER (1987) Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max* Proc Natl Acad Sci USA 84:7428-7432

Kruszka K, Wolko B (1999) Linkage maps of morphological and molecular markers in lupin. In: van Santen E, Wink M, Weissmann S, Roemer P (eds) 9th International Lupin Conference, Klink/Müritz, Germany, 1999. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand, pp 100-106

Książkiewicz M, Karłowski W, Yang H, Wolko B Physical and genetic analysis of genome region conferring resistance to fungal pathogens in the narrow-leafed lupin. In: Palta JA, Berger JB (eds) 12th International Lupin Conference "Lupins for Health and Wealth", Fremantle, Western Australia, 2008. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand, pp 263-266

Książkiewicz M, Leśniewska K, Mahé F, Naganowska B, Misset M-T, Aïnouche A, Wolko B (2009) Nodulation *SymRK*-gene region in the narrow leafed lupin genome: localization, structure and annotation Acta Biologica Cracoviensia 51:79

Książkiewicz M et al. (2017) A high-density consensus linkage map of white lupin highlights synteny with narrow-leafed lupin and provides markers tagging key agronomic traits Sci Rep 7:15335 doi:10.1038/s41598-017-15625-w

Książkiewicz M, Rychel S, Nelson MN, Wyrwa K, Naganowska B, Wolko B (2016) Expansion of the phosphatidylethanolamine binding protein family in legumes: a case study of *Lupinus angustifolius* L. *FLOWERING LOCUS T* homologs, *LanFTc1* and *LanFTc2* BMC Genomics 17:820 doi:10.1186/s12864-016-3150-z

Książkiewicz M et al. (2013) Comparative genomics of *Lupinus angustifolius* gene-rich regions: BAC library exploration, genetic mapping and cytogenetics BMC Genomics 14:79 doi:10.1186/1471-2164-14-79

Książkiewicz M et al. (2015) Remnants of the legume ancestral genome preserved in gene-rich regions: insights from *Lupinus angustifolius* physical, genetic, and comparative mapping Plant Mol Biol Rep 33:84-101 doi:10.1007/s11105-014-0730-4

Kwak M, Velasco D, Gepts P (2008) Mapping homologous sequences for determinacy and photoperiod sensitivity in common bean (*Phaseolus vulgaris*) J Hered 99:283-291 doi:10.1093/jhered/esn005

Lapcik O (2007) Isoflavonoids in non-leguminous taxa: a rarity or a rule? Phytochemistry 68:2909-2916 doi:10.1016/j.phytochem.2007.08.006

Laurie RE et al. (2011) The *Medicago FLOWERING LOCUS T* homolog, *MtFTa1*, is a key regulator of flowering time Plant Physiol 156:2207-2224 doi:10.1104/pp.111.180182

Lavin M, Herendeen PS, Wojciechowski MF (2005) Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary Syst Biol 54:575-594 doi:10.1080/10635150590947131

Leśniewska K, Książkiewicz M, Nelson MN, Mahé F, Aïnouche A, Wolko B, Naganowska B (2011) Assignment of 3 genetic linkage groups to 3 chromosomes of narrow-leafed lupin J Hered 102:228-236 doi:10.1093/jhered/esq107

Lewis G, Schrirer B, Mackinder B, Lock M (2005) Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew

Li X, Buirchell B, Yan G, Yang H (2012a) A molecular marker linked to the *mollis* gene conferring soft-seediness for marker-assisted selection applicable to a wide range of crosses in lupin (*Lupinus angustifolius* L.) breeding Mol Breed 29:361-370 doi:10.1007/s11032-011-9552-3

Li X, Renshaw D, Yang H, Yan G (2010) Development of a co-dominant DNA marker tightly linked to gene *tardus* conferring reduced pod shattering in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) Euphytica 176:49-58 doi:10.1007/s10681-010-0212-1

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 62:218-224 doi:doi.org/10.1071/CP10352

Li X, Yang H, Yan G (2012b) Development of a co-dominant DNA marker linked to the gene *lentus* conferring reduced pod shattering for marker-assisted selection in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius*) breeding Plant Breeding 131:540-544 doi:10.1111/j.1439-0523.2012.01978.x

Liu Y et al. (2015) Molecular cloning, expression, and evolution analysis of type II CHI gene from peanut (*Arachis hypogaea* L.) Dev Genes Evol 225:1-10 doi:10.1007/s00427-015-0489-0

Lu S et al. (2011) The glossyhead1 allele of ACC1 reveals a principal role for multidomain acetyl-coenzyme A carboxylase in the biosynthesis of cuticular waxes by *Arabidopsis* Plant Physiol 157:1079-1092 doi:10.1104/pp.111.185132

Mahé F et al. Comparative analysis of the Symbiotic-RK genomic region between *Lupinus* and model legumes. In: Naganowska B, Wolko B, Kachlicki P (eds) 13th International Lupin Conference, Poznań, Poland, 2011. Institute of Plant Genetics Polish Academy of Sciences, Poznań, pp 54-59

McClean PE, Mamidi S, McConnell M, Chikara S, Lee R (2010) Synteny mapping between common bean and soybean reveals extensive blocks of shared loci BMC Genomics 11:184 doi:10.1186/1471-2164-11-184

Mikolajczyk J (1966) Genetic studies in *Lupinus angustifolius*. 2. Inheritance of some morphological characters in blue lupine Genetica Polonica 7:153-180

Moore RC, Purugganan MD (2005) The evolutionary dynamics of plant duplicate genes Curr Opin Plant Biol 8:122-128 doi:10.1016/j.pbi.2004.12.001

Morita Y et al. (2014) A chalcone isomerase-like protein enhances flavonoid production and flower pigmentation The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology 78:294-304 doi:10.1111/tpj.12469

Mudge J, Cannon SB, Kalo P, Oldroyd GE, Roe BA, Town CD, Young ND (2005) Highly syntenic regions in the genomes of soybean, *Medicago truncatula*, and *Arabidopsis thaliana* BMC Plant Biol 5:15 doi:10.1186/1471-2229-5-15

Mun J-H et al. (2006) Distribution of microsatellites in the genome of *Medicago truncatula*: a resource of genetic markers that integrate genetic and physical maps Genetics 172:2541-2555 doi:10.1534/genetics.105.054791

Naganowska B, Wolko B, Sliwińska E, Kaczmarek Z (2003) Nuclear DNA content variation and species relationships in the genus *Lupinus* (Fabaceae) Ann Bot 92:349-355 doi:10.1093/aob/mcg145

Naganowska B, Wyrwa K, Szczepaniak A, Przysiecka Ł, Książkiewicz M, Wolko B Cytogenetic mapping – a step towards an integrated genome map of *Lupinus angustifolius*. In: Naganowska B, Wolko B, Kachlicki P (eds) 13th International Lupin Conference, Poznan, Poland, 2011. Institute of Plant Genetics Polish Academy of Sciences, pp 60-66

Narożna D, Książkiewicz M, Przysiecka Ł, Króliczak J, Wolko B, Naganowska B, Mądrzak CJ (2017) Legume isoflavone synthase genes have evolved by whole-genome and local duplications yielding transcriptionally active paralogs Plant Sci 264:149-167 doi:10.1016/j.plantsci.2017.09.007

Neff MM, Neff JD, Chory J, Pepper AE (1998) dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics Plant J 14:387-392 doi:10.1046/j.1365-313X.1998.00124.x

Nelson MN et al. (2017) The loss of vernalization requirement in narrow-leafed lupin is associated with a deletion in the promoter and de-repressed expression of a *Flowering Locus T* (*FT*) homologue New Phytol 213:220-232 doi:10.1111/nph.14094

Nelson MN et al. (2006) The first gene-based map of *Lupinus angustifolius* L.-location of domestication genes and conserved synteny with *Medicago truncatula* Theor Appl Genet 113:225-238 doi:10.1007/s00122-006-0288-0

Ngaki MN et al. (2012) Evolution of the chalcone-isomerase fold from fatty-acid binding to stereospecific catalysis Nature 485:530-533 doi:10.1038/nature11009

Nikolau BJ, Ohlrogge JB, Wurtele ES (2003) Plant biotin-containing carboxylases Arch Biochem Biophys 414:211-222 doi:10.1016/S0003-9861(03)00156-5

Olson-Manning CF, Lee CR, Rausher MD, Mitchell-Olds T (2013) Evolution of flux control in the glucosinolate pathway in *Arabidopsis thaliana* Mol Biol Evol 30:14-23 doi:10.1093/molbev/mss204

Peer WA, Murphy AS (2007) Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? Trends Plant Sci 12:556-563

Peoples MB et al. (2009) The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems Symbiosis 48:1-17 doi:10.1007/bf03179980

Pfeil BE, Schlueter JA, Shoemaker RC, Doyle JJ (2005) Placing paleopolyploidy in relation to taxon divergence: a phylogenetic analysis in legumes using 39 gene families Syst Biol 54:441-454 doi:10.1080/10635150590945359

Phan HTT, Ellwood SR, Adhikari K, Nelson MN, Oliver RP (2007) The first genetic and comparative map of white lupin (*Lupinus albus* L.): identification of QTLs for anthracnose resistance and flowering time, and a locus for alkaloid content DNA Res 14:59-70 doi:10.1093/dnares/dsm009

Pičmanová M, Reňák D, Feciková J, Růžička P, Mikšátková P, Lapčík O, Honys D (2013) Functional expression and subcellular localization of pea polymorphic isoflavone synthase CYP93C18 Biol Plant 57:635-645 doi:10.1007/s10535-013-0344-y

Post-Beittenmiller D (1996) Biochemistry and molecular biology of wax production in plants Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47:405-430 doi:10.1146/annurev.arplant.47.1.405

Przysiecka Ł, Książkiewicz M, Wolko B, Naganowska B (2015) Structure, expression profile and phylogenetic inference of chalcone isomerase-like genes from the narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) genome Front Plant Sci 6:268 doi:10.3389/fpls.2015.00268

Rychel S, Książkiewicz M, Tomaszewska M, Bielski W, Wolko B (2019) *FLOWERING LOCUS T*, *GIGANTEA*, *SEPALLATA* and *FRIGIDA* homologs are candidate genes involved in white lupin (*Lupinus albus* L.) early flowering Mol Breed 39:43 doi:10.1007/s11032-019-0952-0

Sasaki Y, Konishi T, Nagano Y (1995) The compartmentation of acetyl-coenzyme A carboxylase in plants Plant Physiol 108:445-449 doi:10.1104/pp.108.2.445

Sato S et al. (2008) Genome structure of the legume, *Lotus japonicus* DNA Res 15:227-239 doi:10.1093/dnares/dsn008

Schlueter JA, Dixon P, Granger C, Grant D, Clark L, Doyle JJ, Shoemaker RC (2004) Mining EST databases to resolve evolutionary events in major crop species Genome 47:868-876 doi:10.1139/g04-047

Schlueter JA, Scheffler BE, Jackson S, Shoemaker RC (2008) Fractionation of synteny in a genomic region containing tandemly duplicated genes across *Glycine max*, *Medicago truncatula*, and *Arabidopsis thaliana* The Journal of heredity 99:390-395 doi:10.1093/jhered/esn010

Shankar M, Sweetingham MW, Cowling WA (2002) Identification of alleles at two loci controlling resistance to Phomopsis stem blight in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) Euphytica 125:35-44 doi:10.1023/A:1015704728492

Stefanović S, Pfeil BE, Palmer JD, Doyle JJ (2009) Relationships among phaseoloid legumes based on sequences from eight chloroplast regions Syst Bot 34:115-128 doi:10.1600/036364409787602221

Stracke S, Sato S, Sandal N, Koyama M, Kaneko T, Tabata S, Parniske M (2004) Exploitation of colinear relationships between the genomes of *Lotus japonicus*, *Pisum sativum* and *Arabidopsis thaliana*, for positional cloning of a legume symbiosis gene Theor Appl Genet 108:442-449 doi:10.1007/s00122-003-1438-2

Subramanian S, Hu X, Lu G, Odelland JT, Yu O (2004) The promoters of two isoflavone synthase genes respond differentially to nodulation and defense signals in transgenic soybean roots Plant Mol Biol 54:623-639 doi:10.1023/b:plan.0000040814.28507.35

Subramanian S, Stacey G, Yu O (2007) Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation Trends Plant Sci 12:282-285 doi:10.1016/j.tplants.2007.06.006

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

Susek K, Bielski WK, Hasterok R, Naganowska B, Wolko B (2016) A first glimpse of wild lupin karyotype variation as revealed by comparative cytogenetic mapping Front Plant Sci 7 doi:10.3389/fpls.2016.01152

Szczepaniak A, Książkiewicz M, Podkowiński J, Czyż KB, Figlerowicz M, Naganowska B (2018) Legume cytosolic and plastid acetyl-coenzyme-A carboxylase genes differ by evolutionary patterns and selection pressure schemes acting before and after whole-genome duplications Genes 9 doi:10.3390/genes9110563

Takeshima R et al. (2016) A soybean quantitative trait locus that promotes flowering under long days is identified as *FT5a*, a *FLOWERING LOCUS T* ortholog J Exp Bot 67:5247-5258 doi:10.1093/jxb/erw283

Taylor CM et al. (2019) INDEL variation in the regulatory region of the major flowering time gene *LanFTc1* is associated with vernalization response and flowering time in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) Plant, Cell Environ 42:174-187 doi:10.1111/pce.13320

Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S, McCouch S (2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential Genome Res 11:1441-1452 doi:10.1101/gr.184001

Varshney RK et al. (2013) Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement Nat Biotechnol 31:240-246 doi:10.1038/nbt.2491

Vipin CA et al. (2013) Construction of integrated linkage map of a recombinant inbred line population of white lupin (*Lupinus albus* L.) Breeding Science 63:292-300 doi:10.1270/jsbbs.63.292

von Sengbusch R (1942) Süßlupinen und Öllupinen. Die Entstehungsgeschichte einiger neuer Kulturpflanzen Landwirtschaftliche Jahrbücher 91:719-880

Wan H et al. (2016) Time-series analyses of transcriptomes and proteomes reveal molecular networks underlying oil accumulation in canola Front Plant Sci 7:2007 doi:10.3389/fpls.2016.02007

Wang J, Singh SK, Du C, Li C, Fan J, Pattanaik S, Yuan L (2016) Comparative transcriptomic analysis of two *Brassica napus* near-isogenic lines reveals a network of genes that influences seed oil accumulation Front Plant Sci 7:1498 doi:10.3389/fpls.2016.01498

Wang Z et al. (2015) Functional evolution of phosphatidylethanolamine binding proteins in soybean and *Arabidopsis* Plant Cell 27:323-336 doi:10.1105/tpc.114.135103

Wojakowska A, Kułak K, Jasiński M, Kachlicki P, Stawiński S, Stobiecki M (2015) Metabolic response of narrow leaf lupine (*Lupinus angustifolius*) plants to elicitation and infection with *Colletotrichum lupini* under field conditions Acta Physiologiae Plantarum 37:152 doi:10.1007/s11738-015-1896-6

Wojakowska A, Muth D, Narozna D, Madrzak C, Stobiecki M, Kachlicki P (2013) Changes of phenolic secondary metabolite profiles in the reaction of narrow leaf lupin (*Lupinus angustifolius*) plants to infections with *Colletotrichum lupini* fungus or treatment with its toxin Metabolomics 9:575-589 doi:10.1007/s11306-012-0475-8

Wolko B (1995) Markery molekularne w badaniach genetycznych rodzaju Lupinus Hodowla Roślin, Aklimatyzacja i Nasiennictwo 35:3-64

Wolko B et al. Molecular markers for lupin genome mapping developed on the basis of *Medicago truncatula* and *Pisum sativum* sequence databases. In: Van Santen E, Hill GD (eds) 11th International Lupin Conference, Guadalajara, Jalisco, Mexico, 2005. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand, pp 52-56

Wolko B, Kasprzak A, Ksiazkiewicz M (2008) Generowanie polimorfizmu sekwencyjnie zdefiniowanych markerów DNA przydatnych do integracji grup sprzężeń mapy genetycznej z chromosomami *L. angustifolius*. In: Dubert F, Horabik J, Kędziora A, Puchalski J, Święcicki W, Józefaciuk G (eds) Jakość środowiska, surowców i żywności. Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN, Lublin, pp 185-187

Wolko B, Książkiewicz M, Majcherkiewicz K, Wyrwa K (2010) Markery STS sprzężone z genami odporności na grzyby patogeniczne u łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.). In: Jakość środowiska, surowców i żywności. Kraków, pp 169-170

Woo H-H, Jeong BR, Hawes MC (2005) Flavonoids: from cell cycle regulation to biotechnology Biotechnol Lett 27:365-374 doi:10.1007/s10529-005-1521-7

Wyrwa K, Książkiewicz M, Szczepaniak A, Susek K, Podkowiński J, Naganowska B (2016) Integration of *Lupinus angustifolius* L. (narrow-leafed lupin) genome maps and comparative mapping within legumes Chromosome Res 24:355-378 doi:10.1007/s10577-016-9526-8

Yang H, Boersma JG, You M, Buirchell BJ, Sweetingham MW (2004) Development and implementation of a sequence-specific PCR marker linked to a gene conferring resistance to anthracnose disease in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) Mol Breed 14:145-151 doi:10.1023/B:MOLB.0000038003.49638.97

Yang H, Renshaw D, Thomas G, Buirchell B, Sweetingham M (2008a) A strategy to develop molecular markers applicable to a wide range of crosses for marker assisted selection in plant breeding: a case study on anthracnose disease resistance in lupin (*Lupinus angustifolius* L.) Mol Breed 21:473-483 doi:10.1007/s11032-007-9146-2

Yang H, Shankar M, Buirchell J, Sweetingham W, Caminero C, Smith C (2002) Development of molecular markers using MFLP linked to a gene conferring resistance to *Diaporthe toxica* in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) Theor Appl Genet 105:265-270 doi:10.1007/s00122-002-0925-1

Yang H, Sweetingham MW, Cowling WA, Smith PMC (2001) DNA fingerprinting based on microsatellite-anchored fragment length polymorphisms, and isolation of sequence-specific PCR markers in lupin (*Lupinus angustifolius* L.) Mol Breed 7:203-209 doi:10.1023/A:1011363205557

Yang H et al. (2013a) Rapid development of molecular markers by next-generation sequencing linked to a gene conferring phomopsis stem blight disease resistance for marker-assisted selection in lupin (*Lupinus angustifolius* L.) breeding Theor Appl Genet 126:511-522 doi:10.1007/s00122-012-1997-1

Yang H et al. (2013b) Draft genome sequence, and a sequence-defined genetic linkage map of the legume crop species *Lupinus angustifolius* L PloS one 8:e64799 doi:10.1371/journal.pone.0064799

Yang S et al. (2008b) Alfalfa benefits from *Medicago truncatula*: the *RCT1* gene from *M. truncatula* confers broad-spectrum resistance to anthracnose in alfalfa Proc Natl Acad Sci U S A 105:12164-12169 doi:10.1073/pnas.0802518105

You M, Boersma JG, Buirchell BJ, Sweetingham MW, Siddique KHM, Yang H (2005) A PCR-based molecular marker applicable for marker-assisted selection for anthracnose disease resistance in lupin breeding Cell Mol Biol Lett 10:123-134

Zielezinski A, Potarzycki P, Książkiewicz M, Karłowski W (2012) Annotating a non-model plant genome – a study on the narrow-leafed lupin Biotechnologia 93:318-332

Michał Książkiewicz