

Dr Beata Myśków
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
ul. Słowackiego 17
71-434 Szczecin

Informacja o działalności naukowej, dydaktycznej i organizacyjnej

(Autoreferat)

Osiągnięcia naukowe

Moja działalność badawcza związana jest ściśle z genetyką molekularną. Pierwsze prace badawcze wykonywałam pod kierunkiem pana prof. dr hab. Romana Zielińskiego w Katedrze Genetyki Uniwersytetu Szczecińskiego w ramach pracy magisterskiej. Badania dotyczyły zróżnicowania genetycznego małża z gatunku *Dreissena polymorpha*, występującego w jeziorach Pomorza Zachodniego i prowadzone były przy wykorzystaniu techniki elektroforezy białek izoenzymatycznych w żelu skrobiowym. Wyniki prac badawczych zamieszczone zostały w pracy magisterskiej pt „Analiza struktury genetycznej populacji małża *Dreissena polymorpha* Pall. z jezior Pomorza Zachodniego”.

Po zakończeniu studiów podjęłam studia doktoranckie w Akademii Rolniczej w Szczecinie, w Katedrze Hodowli Roślin, kierowanej wówczas przez prof. dr hab. Mirosława Łapińskiego. Moim opiekunem naukowym był dr hab. (obecnie prof. dr hab.) Piotr Masojć. Pod jego kierunkiem podjęłam badania związane z genetyczną charakterystyką żyta, zmierzające w głównej mierze do skonstruowania dokładnej mapy genetycznej tego gatunku. Przy użyciu technik molekularnych obejmujących elektroforetyczną analizę izoenzymów w żelach poliakrylamidowych (PAGE) i łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) z niespecyficznymi starterami (RAPD) uzyskałam markery molekularne potrzebne do zagęszczenia mapy sprzężeń mieszańca DS2×RXL10. Szkielet mapy składał się wówczas wyłącznie z markerów RFLP a markery bazujące na reakcji PCR były pierwszymi tego typu markerami uzyskanymi dla tego gatunku. Markery RAPD posłużyły także do oceny zróżnicowania genetycznego kolekcji linii wsobnych żyta pochodzących z zasobów naszej katedry oraz z firmy hodowlanej DANKO. Uzyskane wyniki stały się podstawą do napisania

rozprawy doktorskiej: „Konstruowanie mapy genetycznej żyta przy wykorzystaniu markerów molekularnych – RAPD i izoenzymów”.

Po uzyskaniu stopnia doktora zostałam zatrudniona w Katedrze Hodowli Roślin Akademii Rolniczej w Szczecinie na stanowisku adiunkta, które zajmuję do tej pory. W międzyczasie uczelnia zmieniła strukturę i nazwę, stając się - po połączeniu z Politechniką Szczecińską - Zachodniopomorskim Uniwersytetem Technologicznym w Szczecinie. Nasza katedra nosi obecnie nazwę Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin.

Głównym przedmiotem moich badań pozostaje niezmiennie żyto, a głównym kierunkiem badawczym jest poszukiwanie markerów molekularnych genomu żyta i identyfikacja markerów ważnych pod względem użytkowym cech, głównie porostania przedźniwnego (PHS) i związanej z nim aktywności amylazy (AA), wczesności kłoszenia (HE) oraz cech morfologicznych a także męskiej sterility. Ten cel realizowany jest poprzez konstruowanie map genetycznych i identyfikację obszarów genomu zawierających *loci* badanych cech. Część moich badań poświęcona jest ocenie zależności fenetycznych linii wsobnych żyta pochodzących z kolekcji katedry jak również z firm hodowlanych. Dodatkowym obszarem moich naukowych zainteresowań jest zróżnicowanie genetyczne nicieni owadobójczych z rodzaju *Steinernematidae* i *Heterorhabditidae*.

Konstruowanie map genetycznych

Badania związane z konstruowaniem map genetycznych rozpoczęłam od udziału w zagęszczaniu mapy genetycznej pokolenia F2 mieszańca DS2×RXL10. Była to pierwsza kompletna (złożona z siedmiu grup sprzężeń) mapa żyta skonstruowana przez zespół prof. M.D. Gale'a z John Innes Center Institute (Norwich, UK). Mapa wykonana z użyciem techniki RFLP była przy moim udziale sukcesywnie wzbogacana o nowe markery bazujące na aktualnie dostępnych technikach molekularnych. Nowe markery tworzone były z wykorzystaniem metody PCR ze starterami o losowych sekwencjach. Wyniki tych badań prezentują między innymi, poza rozprawą doktorską, publikacje z *Theoretical and Applied Genetics* oraz *Journal of Applied Genetics* (2.1.2, 2.1.3, 2.1.4, 2.2.1, 2.2.2). Moim zadaniem były zarówno prace zmierzające do uzyskania materiału roślinnego, analizy molekularne jak i proces komputerowej analizy danych. Do mapowania wykorzystywałam wówczas program MAPMAKER 3.0. Rozbudowywana mapa populacji DS2×RXL10 pozostawała przez kilkanaście lat najsilniej zagęszczoną mapą żyta i służyła jako mapa referencyjna w wielu

badaniach zmierzających do tworzenia nowych map sprzężeń żyta i pszenżyta, między innymi mapy mieszańca żyta 541×Ot1-3 (2.1.4).

Jednym z kolejnych osiągnięć w dziedzinie mapowania genetycznego było opracowanie i opublikowanie przez zespół pracowników naszej katedry silnie zagęszczonej mapy chromosomu 6R (2.1.5), będącej pierwszą zintegrowaną mapą stworzoną dla żyta przy wykorzystaniu programu JoinMap 3.0 pozwalającego na jednoczesne analizowanie danych otrzymanych z kilku populacji mapujących.

Wśród zadań wykonywanych przeze mnie po zatrudnieniu na stanowisku adiunkta było koordynowanie prac nad kolejną mapą genetyczną żyta tworzoną od podstaw. Była to mapa pokolenia F2 mieszańca S120×S76, tworzona początkowo przy pomocy programu MAPMAKER 3.0 (2.2.1), ale ostatecznie skonstruowana przy użyciu programu komputerowego JoinMap 3.0 z markerów PCR bazujących w większości na starterach o losowych sekwencjach (2.2.4). Posłużyła ona między innymi jako narzędzie do oceny przydatności markerów RAPD i ISSR w tworzeniu nowej mapy genetycznej i identyfikacji grup sprzężeń oraz do analizy tak zwanej transferowalności markerów, czyli skuteczności w wykorzystaniu tych samych markerów do konstruowania i rozbudowy różnych map tego samego gatunku. Mieszańiec wykorzystany w tych badaniach stanowił podstawę do wyhodowania przeze mnie populacji składającej się z zestawu rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL), które były głównym materiałem badawczym w moich dalszych pracach.

Z uwagi na brak dostępnych informacji o sekwencjach DNA żyta, w swoich pracach wykorzystywałam głównie markery o charakterze losowym (RAPD, ISSR, AFLP) ale także markery specyficzne (SSR i STS). Większość ze stosowanych metod molekularnych nie pozwalała na osiągnięcie dużej wydajności. Część z nich zapewniała co prawda uzyskanie bardzo wielu markerów ale odbywało się to kosztem pracochłonnych analiz. Pojawienie się techniki DArT (Diversity Array Technology) wykorzystującej technologię mikromacierzy umożliwiło znaczne przyspieszenie badań nad identyfikacją nowych markerów charakteryzujących genomy roślinne, w tym genom żyta. Ta technologia umożliwia szybkie uzyskanie danych o segregacji tysięcy markerów, co pozwala na skonstruowanie w stosunkowo krótkim czasie map genetycznych o dużej gęstości.

Dzięki nawiązaniu współpracy naukowej z zespołem z Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin z SGGW z Warszawy i udziałowi w projekcie badawczym kierowanym przez prof. Monikę Rakoczy-Trojanowską (3.2.7) możliwe stało się utworzenie w oparciu o markery DArT silnie zagęszczonych map pięciu populacji RIL żyta (w tym

S120×S76) i stworzenie najbardziej nasyconej mapy zintegrowanej tego gatunku. Analizy DArT wykonane zostały przy współpracy z firmą Diversity Array Technology Pty Ltd (Yarralumla, Australia).

Zanim wyniki prac nad zintegrowaną mapą wszystkich badanych mieszańców opracowano w programie MultiPoint Consensus 2.2 i opublikowano w czasopiśmie PLoS One (2.1.8), zostały one przeze mnie wykorzystane do skonstruowania przy pomocy programu JoinMap 3.0 czterech niezależnych silnie zagęszczonych map żyta. Mapy te posłużyły następnie do lokalizacji QTL cech stanowiących przedmiot moich badawczych zainteresowań – PHS oraz wczesności. Uzyskane rezultaty stały się podstawą mojej monografii habilitacyjnej zatytułowanej „Identyfikacja *loci* cech ilościowych (QTL) kontrolujących wczesność i podatność na porastanie u żyta (*Secale cereale* L.) z wykorzystaniem zagęszczonych map genetycznych populacji rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL)”.

Identyfikacja QTL

Jednym z ważniejszych problemów badawczych, którym poświęcam uwagę jest zjawisko porastania przedźniwnego u żyta. Jest to ważna pod względem agronomicznym cecha o bardzo złożonym podłożu genetycznym. Do poznania mechanizmów jej dziedziczenia konieczne jest posiadanie odpowiedniego materiału badawczego. Jedną ze strategii badania cech wielogenowych, wybraną przeze mnie do analizy PHS jest analiza QTL (*loci* cech ilościowych). Aby wyniki były jak najbardziej miarodajne niezbędne jest dysponowanie silnie zagęszczoną mapą genetyczną badanego gatunku. Z kolei dla zwiększenia wiarygodności analiz QTL wymagane jest wielokrotne powtarzanie ocen fenotypowych. Do realizacji tych wymagań dobrze nadaje się populacja mapująca złożona z rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL). Linie wsobne wybrane do utworzenia mieszańca stanowiącego główny materiał badawczy w moich pracach pochodziły ze źródeł komercyjnej hodowli, co miało na celu zidentyfikowanie markerów mogących znaleźć zastosowanie w praktyce hodowlanej.

Utworzenie mapy genetycznej i analizy QTL przebiegały dwuetapowo. W pierwszym etapie analizie poddane zostało pokolenie F2 mieszańca a w drugim bazowano na wyprowadzonej z niego populacji RIL.

Populacja mapująca F2 posłużyła do skonstruowania mapy genetycznej złożonej ostatecznie ze 141 markerów (2.2.4) i do identyfikacji QTL kontrolujących PHS i AA (2.2.1,

2.1.6). Liczba wykrytych QTL była stosunkowo niewielka w porównaniu z rezultatami osiąganymi wcześniej przez moich współpracowników dla dwóch innych map żyta. Pokolenie F2 nie pozwalało na weryfikację moich wyników, ponieważ tego typu materiał charakteryzuje brak możliwości dokonywania wielokrotnych ocen interesujących cech. Fenotypowanie ogranicza się tylko do roślin pokolenia F2, względnie ich potomstw - F3.

Możliwość corocznego powtarzania analiz badanych cech i weryfikacji wyników uzyskanych dla danego mieszańca daje zastosowanie linii wsobnych wyprowadzonych z pokolenia F2. Tego typu materiał, określany skrótem RIL, wymaga długotrwałych przygotowań. Uzyskanie odpowiedniego do wykonania badań poziomu wsobności populacji mapującej trwało w przypadku mojego materiału osiem lat. Dopiero po tym czasie celowe stało się pobranie DNA i skonstruowanie mapy sprzężeń oraz dalsze analizy fenotypowe, które przeprowadzano w 3-4 powtórzeniach w kolejnych sezonach wegetacyjnych. Równoległe z analizą PHS dokonywałam oceny terminu kłoszenia na tym samym materiale oraz na trzech innych populacjach RIL, wyprowadzanych przez współpracowników z Katedry, przy moim udziale.

Zagęszczone mapy czterech populacji RIL posłużyły do lokalizacji QTL kontrolujących wczesność oraz w przypadku mapy S120×S76 także PHS. Wyniki tych badań znalazły się w mojej monografii habilitacyjnej. Wykorzystanie rozbudowanych map populacji RIL pozwoliło m.in. wyjaśnić wątpliwości dotyczące małej liczby QTL na mapie F2 mieszańca S120×S76. Okazało się, że zróżnicowanie obecne u badanego mieszańca w pewnych regionach kontrolujących przedźniwne porastanie nie zostało wcześniej wykryte, bowiem na mapie populacji RIL wykryto aż 31 QTL porastania, co wskazuje na przewagę zastosowania do analizy QTL zagęszczonej mapy genetycznej oraz populacji linii wsobnych. Na analizowanych czterech mapach wykryto ponadto 58 QTL kontrolujących wczesność, uzupełniając znacząco wiedzę o obszarach genomu żyta odpowiedzialnych za tą ważną z punktu widzenia praktyki rolniczej cechę.

Poza przedstawieniem zagęszczonych map i wyników analiz QTL praca ukazuje zależności między porastaniem i wczesnością, które dotychczas nie były badane. Analiza porównawcza QTL wykazała, że wiele QTL porastania pokrywało się całkowicie, lub częściowo z QTL wczesności. Można uznać, że potencjalnie 20 regionów zawierających *loci* porastania wykazywało przynajmniej częściowy związek swojej lokalizacji z QTL wczesności. To aż 66% QTL porastania i 34% z 59 regionów kontrolujących wczesność we

wszystkich czterech populacjach. Dotychczasowe doniesienia literaturowe donosiły o jednym QTL wspólnym dla przedźniwnego porastania i terminu kłoszenia oraz spoczynku u pszenicy.

Pokrywanie się obszarów zawierających *loci* kontrolujące porastanie i wczesność odpowiadało w przybliżeniu zależności między lokalizacją QTL porastania i aktywności α -amylazy, wykazanej wcześniej przez współpracowników katedry która w przeliczeniu na udział OTL wspólnych w stosunku do QTL dla PHS wyniosła 69,2%.

Dzięki uzyskanym wynikom możliwe było wykazanie, że przewidywana wcześniej współzależność dziedzicznego podłoża obu cech istnieje, ale nie jest bezpośrednią zależnością, pozwalającą stwierdzić, że wczesne formy żyta będą wykazywały skłonność do silniejszego porastania. Liczba *loci* niezależnie zaangażowanych w kontrolę każdej z badanych cech jest na tyle duża, że kombinacje alleli umożliwiają pojawienie się wśród grupy roślin wczesnych zarówno form podatnych jak i odpornych na porastanie. Podobne zróżnicowanie dotyczy grupy roślin o późnym terminie kłoszenia.

Związek między genami wczesności i porastania o podobnej lokalizacji może polegać tylko na ich sprzężeniu, ale istnieje też możliwość, że część z nich to geny o efektach plejotropowych, zaangażowane w kontrolę obu cech. Ponieważ jednak geny te działają na różnych etapach rozwoju i w interakcji z różnymi warunkami środowiska nie ma prostej zależności między badanymi cechami.

Niezależnie od rodzaju współdziałań między genami i od mechanizmów działania regulujących obie cechy, możliwe jest prowadzenie selekcji w celu wytworzenia korzystnych dla uprawy form wczesnych, jednocześnie odpornych na przedźniwne porastanie. Wyniki przedstawione w monografii wskazują markery mogące stać się użytecznymi w selekcji wczesnych i zarazem odpornych na porastanie form żyta.

Kontynuację i rozwinięcie badań nad genetycznym podłożem porastania i wczesności zakłada projekt badawczy, którym kieruję od 2010 roku (3.1.1). W wyniku realizacji zadań zaplanowanych w grantie i z wykorzystaniem wcześniejszych osiągnięć opublikowana została praca w czasopiśmie *Molecular Breeding* (2.1.9). Przedstawiono w niej rezultaty badań nad porastaniem wzbogacone o wyniki analiz PHS z dodatkowego sezonu wegetacyjnego oraz dołączono wyniki z trzyletniej oceny aktywności α -amylazy. Dokonano analizy zależności lokalizacji QTL poszczególnych cech. Na mapie zidentyfikowano 14 QTL aktywności α -amylazy, czyli więcej niż udało się wykryć na mapie pokolenia F2 tego samego mieszańca, co podobnie jak w przypadku analizy QTL warunkujących podatność na porastanie przemawia na korzyść zastosowania do analizy QTL silnie zagęszczonej mapy

genetycznej oraz populacji rekombinacyjnych linii wsobnych. Zależność między lokalizacją genów kontrolujących PHS i AA została stwierdzona w 6 przypadkach i dla takiej samej liczby regionów genomu wykazano związek między genami porastania i wczesności.

Znajomość regionów genomu zaangażowanych w kontrolę wczesności i porastania stanowi dobrą podstawę do analizy porównawczej z QTL innych cech. Obecnie zajmuję się badaniami mającymi na celu wykazanie powiązań między lokalizacją QTL wczesności, porastania, aktywności α -amylazy oraz cech morfologicznych u żyta, z wykorzystaniem dwóch map konsensusowych. Uzyskane wyniki (2.3.24) wskazują na liczne zależności rozmieszczenia na mapie QTL zarówno porastania i cech morfologicznych jak też wczesności i cech morfologicznych oraz wszystkich trzech grup cech. W pierwszym przypadku wykazano głównie sprzężenia genów kontrolujących PHS i morfologię kłosa (długość, liczbę kłosków, zbitość), w drugim obserwowano związek położenia QTL wczesności i cech morfologicznych charakteryzujących przede wszystkim ziarniakę (liczba i masa ziaren). Niezależnie od tego czy geny badanych cech wykazują działanie plejotropowe czy też są genami sprzężonymi, możliwe jest wytypowanie markerów przydatnych w selekcji korzystnych dla uprawy form żyta.

Swoje doświadczenia w analizie QTL wykorzystałam do nawiązania współpracy z pracownikami Instytutu Fizjologii Roślin PAN w Krakowie, czego wynikiem jest praca opublikowana w Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization (2.2.7).

Inne badania z zastosowaniem markerów molekularnych

Inne prace badawcze w których realizację byłam zaangażowana, to kierowane przez dr hab. Stefana Stojalowskiego (3.2.8, 3.2.10) badania związane z identyfikacją genów przywracających męską płodność u żyta z cytoplazmą sterylizującą typu CMS-C, których wyniki prezentowane były w kilku publikacjach lub doniesieniach (2.1.7, 2.3.16, 2.3.18, 2.3.20, 2.3.22) i wykorzystywane są w pracach związanych z hodowlą odmian mieszańcowych. Uczestniczyłam też projekcie o tematyce dotyczącej zjawiska cytoplazmatycznej męskiej sterility u pszenżyta (3.2.5) Był to grant celowy współfinansowany przez DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. oraz Ministerstwo Nauki i Informatyzacji, koordynowany przez panią prof. dr hab. Marię Wędzony z Instytutu Fizjologii Roślin PAN w Krakowie.

Kolejną cechą żyta, w której badaniach biorę udział jest zjawisko karłowatości. Badania nad genetycznym uwarunkowaniem tej cechy, stwierdzonej w materiale

