

dr Hieronim Golczyk

ZAŁĄCZNIK nr 2 – AUTOREFERAT

Katedra Biologii Molekularnej
Instytut Biotechnologii
Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II

Lublin 2014

Podziękowania:

- *Dziękuję wszystkim Pracownikom Wydziału Biotechnologii i Ochrony Środowiska KUL, w szczególności Panu prof. dr hab. Ryszardowi Szyszce, za życzliwość, miłą i ciepłą atmosferę.*
- *Dziękuję wszystkim Pracownikom Instytutu Botaniki Uniwersytetu Jagiellońskiego za życzliwość dla mnie w czasie mojej wieloletniej pracy.*
Szczególnie dziękuję:
 - *Panu prof. dr hab. Andrzejowi Joachimiakowi - za owocną współpracę oraz cenne rady i wskazówki.*
 - *Panu dr hab. Tomaszowi Ilnickiemu – za współpracę, zrozumienie, chęć do niesienia bezinteresownej pomocy w różnych, zawodowych i życiowych sytuacjach oraz za miłą i spokojną atmosferę w pokoju, w którym przyszło nam razem pracować.*
 - *Pani dr Krystynie Musiał - za zrozumienie, współpracę i koleżeńską pomoc w barwieniu DAPI komórek mejotycznych wiesiołka.*
- *Dziękuję Pani prof. dr hab. Jolancie Małuszyńskiej oraz Panu prof. dr hab. Robertowi Hasterokowi (Katedra Anatomii i Cytologii Roślin, Uniwersytet Śląski, Katowice) za umożliwienie mi opanowania podstaw metody FISH, współpracę i życzliwość.*
- *Dziękuję Panu prof. Andreasowi Houbenowi oraz Pani Katrin Kumke (IPK, Gatersleben, Niemcy) za umożliwienie mi nauki wykrywania modyfikacji histonów na chromosomach, oraz za miłą atmosferę i życzliwość.*

Hieronim Golczyk

1. Imię i nazwisko: Hieronim Golczyk

2. Dane kontaktowe:

Katedra Biologii Molekularnej,
Instytut Biotechnologii,
Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II,
ul. Konstantynów 1i, 20-708, Lublin

tel. : +48 81 454-54-45 (pokój), +48 81 445-45-53 (Dziekanat)

fax: +48 81 445-45-51

e-mail:

www:

3. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

2000r. Doktor nauk biologicznych w zakresie biologii. Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego.

1993r. Magister biologii. Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego.

4. Tytuł pracy doktorskiej, Promotor, Recenzenci:

- **Tytuł:** „Struktura kariotypu oraz jąder interfazowych u *Rhoeo spathacea* (Swartz) Stearn (*Commelinaceae*)”
- **Promotor:** Prof. dr hab. Andrzej Joachimiak (Uniwersytet Jagielloński)
- **Recenzenci:** Prof. dr hab. Maria Olszewska (Uniwersytet Łódzki), Prof. dr hab. Lesław Przywara (Uniwersytet Jagielloński)

5. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

2010r. – obecnie Adiunkt. Katedra Biologii Molekularnej, Instytut Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku. Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Lublin.

2004r. – 2010r. Adiunkt. Zakład Cytologii i Embriologii Roślin, Instytut Botaniki, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków.

1996r. – 2004r. Asystent. Zakład Cytologii i Embriologii Roślin, Instytut Botaniki, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków.

6. Praca naukowa – najważniejsze dane:

	A	B
1) Publikacje w punktowanych czasopismach naukowych, w tym:		
1a) publikacje eksperymentalne	Liczba: 18 Punkty MNiSW łącznie: 405 Łączny IF: 69.328	Liczba: 7 Punkty MNiSW łącznie: 160 Łączny IF: 17.908
1b) publikacje - artykuły przeglądowe	Liczba: 1 Punkty MNiSW: 4	-
1c) publikacje konferencyjne	Liczba: 8 Punkty MNiSW łącznie: 160 Łączny IF: 3.567	-
1a + 1b + 1c - podsumowanie zbiorcze	Liczba: 27 Punkty MNiSW łącznie: 569 Łączny IF: 72.895	-
2) A + B	Liczba pozycji: 34 Punkty MNiSW łącznie: 729 Łączny IF: 90.803	
3) Publikacje popularyzujące naukę	1	
4) Materiały konferencyjne poza czasopismami naukowymi, w tym:		
4a) konferencje i sympozja zagraniczne/międzynarodowe, lub o zasięgu międzynarodowym	Liczba: 9	
4b) konferencje i sympozja o zasięgu krajowym	Liczba: 8	
5) Dorobek naukowy łącznie (2+3+4)	Liczba pozycji: 52 Punkty MNiSW łącznie: 729 Łączny IF: 90.803	
6) Liczba grantów MNiSW - <u>wykonawca</u>	3	
7) Liczba grantów MNiSW - <u>kierownik</u>	1	
8) Liczba wszystkich cytowań (z cytowaniami Wnioskodawcy) ¹	213	
9) Liczba cytowań nie będącymi cytacjami Wnioskodawcy ¹	139	
10) <i>h-indeks</i> - Google Scholar ²	9	
11) <i>h-indeks</i> - na podstawie podanego w Załączniku 6 wykazu wszystkich istniejących cytujących źródeł	9	
12) <i>h-indeks</i> - na podstawie <i>Scopus</i> i <i>WoS</i> [*]	7	

A) - Dorobek z wyłączeniem publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

B) – Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego.

¹ Pełna lista wszystkich prac cytujących w Załączniku nr 6.

² źródło: <http://scholar.google.com/citations?user=7Wxo0I8AAAAJ&hl=pl>

* *WoS* (*Web of Science*) i *Scopus* nie potrafią wyszukać wszystkich istniejących źródeł cytujących. Najwięcej źródeł wyszukuje *Google Scholar* i *Google* – patrz Załącznik nr 6.

7. Osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego – opisany poniżej cykl 7 publikacji.

a) Tytuł osiągnięcia naukowego - cyklu 7 publikacji:

„Badania cytogenetyczne nad strukturalną heterozygotycznością u *Oenothera* i *Tradescantia*, ze szczególnym uwzględnieniem permanentnej translokacyjnej heterozygotyczności”

b) Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe * (7 pozycji, łącznie 160 punktów MNiSW, łączny IF = 17.908):

* Udział własny dla każdej z publikacji został przedstawiony w Załączniku nr 3. Prace stanowiące osiągnięcie naukowe cytowane są zgodnie z nadaną im numeracją [1-7]. Aby uniknąć zamieszczania dwóch spisów literaturowych, wszystkie cytowane w Autoreferacie pozycje literaturowe są wyszczególnione na samym końcu Autoreferatu, czyli w Rozdziale 9.

- [1] Golczyk H., Hasterok R., Joachimiak A.J. 2005. FISH-aimed karyotyping and characterization of Renner complexes in permanent heterozygote *Rhoeo spathacea*. *Genome* 48: 145-153. [IF 2005 = 2.070] / 20 pkt. MNiSW].
- [2] Golczyk H., Joachimiak A., Hasterok R. 2008. Pericentromeric GC-rich chromatin in *Rhoeo*. Evidence from soma and germ-line. *Caryologia* 61: 388-391. [IF 2008 = 0.231] / 20 pkt. MNiSW].
- [3] Golczyk H., Hasterok R., Szklarczyk M. 2010. Ribosomal DNA, tri- and bipartite pericentromeres in the permanent translocation heterozygote *Rhoeo spathacea*. *Cellular & Molecular Biology Letters* 15: 651-664. [IF 2010 = 1.455] / 15 pkt. MNiSW].
- [4] Golczyk H. 2011. Cytogenetics of the permanent translocation heterozygote *Rhoeo spathacea* var. *variegata*. Implications for complex chromosome rearrangements in *Rhoeo*. *Caryologia* 64: 325-334. [IF 2011 = 0.533] / 20 pkt. MNiSW].
- [5] Golczyk H. 2011. Breakdown of the balanced lethals in *Rhoeo*. The structure of the alethal Renner complex of the homozygotic stock of *Rhoeo*. *Cytogenetic and Genome Research* 134: 229-233. [IF 2011 = 1.533] / 20 pkt. MNiSW].
- [6] Golczyk H. 2011. Structural heterozygosity, duplication of telomeric (TTTAGGG)_n clusters and B chromosome architecture in *Tradescantia virginiana* L. *Cytogenetic and Genome Research* 134: 234-242. [IF 2011 = 1.533] / 20 pkt. MNiSW].
- [7] Golczyk H., Massouh A., Greiner S. 2014. Translocations of chromosome end-segments and facultative heterochromatin promote meiotic ring formation in evening primroses. *Plant Cell* 26: 1280-1293. [IF 2012 = 9.251] / 45 pkt. MNiSW].

c) Omówienie osiągnięcia naukowego - cyklu 7 publikacji: Wstęp, Cele, Materiał, Metody, Wyniki, Wnioski, Podsumowanie *

* Treść poniższego omówienia została już przedstawiona w języku angielskim w w/w siedmiu recenzowanych i opublikowanych pracach [1-7]. Ponieważ zagraniczne specjalistyczne czasopisma naukowe wymagają bardzo skrótowego i zwięzłego sposobu pisania, aby ułatwić pracę Recenzentom, starałem się niniejszym pewne aspekty bardziej rozwinąć, a więc w sposób w miarę przystępny i poglądowy przedstawić w polskim języku poruszaną tematykę oraz precyzyjnie opisać opublikowane wyniki i ich znaczenie. Pozostaje mi mieć nadzieję, że cel ten został osiągnięty.

Wstęp

Ogólna charakterystyka permanentnej translokacyjnej heterozygotyczności (PTH)

Chromosomowe rearanżacje mają wpływ na procesy specjacji u roślin [8,9,10]. Z tego względu pozostają w centrum zainteresowania cytogenetyki. Istotnym zagadnieniem jest poznanie cytogenetycznych uwarunkowań, odpowiedzialnych za ich powstawanie oraz zrozumienie w jaki sposób mogą one kształtować strategie rozrodczo-adaptacyjne żywych organizmów. Bardzo dogodnymi modelami dla tak pojętej strategii badawczej są różne przejawy heterozygotyczności strukturalnej (np. heterozygotyczność translokacyjna, inwersyjna). Wśród nich na szczególną uwagę zasługuje nieczęsta w świecie roślin, tzw. permanentna translokacyjna heterozygotyczność (PTH), która rozwinęła się w obrębie kilku rodzin *Angiospermae*, m.in. *Commelinaceae* [11,12], *Lobeliaceae* [13], *Iridaceae* [14], *Onagraceae* [15,16], *Papaveraceae* [17].

Wydaje się, że w żadnym innym systemie genetycznym kompleksowe chromosomowe rearanżacje nie są tak spektakularne i tak ściśle powiązane z ewolucją i rozmnażaniem, jak w systemie PTH. Niezwykłą cechą organizmów PTH, związaną z translokacjami, jest zachowanie się chromosomów podczas podziału mejotycznego. W diakinezie i metafazie I zamiast bivalentów formuje się pierścieni lub pierścienie. Jest to skutek heterozygotyczności translokacyjnej, wygenerowanej szeregiem wzajemnych translokacji między chromosomami niehomologicznymi. W czasie anafazy I co drugi chromosom pierścienia segreguje do tego samego bieguna (ang. „alternate segregation”) i w ten sposób powstają dwie segregujące niezależnie od siebie grupy supersprzężeń – tak zwane kompleksy Rennera (kompleks α i kompleks β). Permanentnie heterozygotyczna struktura populacji (osobniki $\alpha\beta$) jest osiągnięta dzięki autogamii (autogamiczna budowa kwiatów) oraz specjalnym systemom rozmnażania (np. allele letalne, geny niekompatybilności, rywalizacja gametofitów, selektywne zapłodnienie) eliminującym osobniki homozygotyczne ($\alpha\alpha$ lub $\beta\beta$). Sugeruje się, że PTH może być pojmowana jako szczególny sposób na osiągnięcie heterozji w obliczu pogłębionej wsobności [16,18]. Istniejące w świecie zwierząt różne przejawy translokacyjnej heterozygotyczności, włączając w to systemy translokacyjne powiązane z chromosomami płci, nie posiadają w/w cech, stąd też według Holsinger i Ellstrand [18], nie należy ich mylić z PTH.

W opracowaniach podręcznikowych PTH jest najczęściej omawiana na przykładzie wiesiołka (*Oenothera*, rodzina *Onagraceae*, liczba chromosomów $2n=14$), ze względu na szczególne bogactwo różnych stopni heterozygotyczności i zróżnicowanych strategii jej utrwalania (np. allele letalne, geny niekompatybilności, rywalizacja gametofitów, selektywne zapłodnienie). Inną tego przyczyną jest fakt, że PTH jest szczególnie częsta w tym taksonie [16,18,19]. Spośród 59 odnotowanych gatunków PTH reprezentujących różne rodziny, 49 należy do rodziny *Onagraceae*, w tym 45 to gatunki *Oenothera* [16,18].

Postuluje się, że w toku ewolucji PTH, wielokrotne rearanżacje chromosomowe spowodowały, że na chromosomach niehomologicznych powstały rozległe rejony o skomplikowanej budowie (ang. „differential segments”) będące m.in. efektem przetasowania segmentów pochodzących z wielu różnych chromosomów, a więc charakteryzujące się wzajemną częściową homologią [20,21]. Ponieważ rekombinacja mejotyczna pomiędzy takimi rejonami (ang. ectopic recombination) doprowadzałaby do powstawania niedozwolonych konfiguracji mejotycznych i w konsekwencji do zaburzeń podziałowych, została ona w systemie PTH ograniczona tylko do końcowych części ramion chromosomowych. Zastosowanie technik genetyki klasycznej i molekularnej pozwala na wniosek, że

rekombinacja między końcami ramion chromosomowych w systemie PTH jest genetycznie neutralna i nie generuje zmienności genetycznej [15,20-22]. Wydaje się więc, że jest potrzebna głównie do zapewnienia regularnej segregacji mejotycznej. Mimo, że miejsca obligatoryjnego crossing-over („recombination hotspots”) nie zostały zmapowane, tradycyjnie uważa się, że występują one w pozycjach terminalnych na chromosomach. Z tego względu struktura dystalnych części chromosomów wydaje się istotna dla zrozumienia systemu PTH. Niestety, była ona do tej pory generalnie bardzo słabo poznana. Ponieważ poziom wykrywalnych wydarzeń rekombinacyjnych w systemie PTH jest bardzo niski (bliski zeru), można przyjąć, że kompleksy Rennera są genomami generalnie nerekombinującymi, co powinno sprzyjać ich molekularnej dywersyfikacji [22, 23]. Drastycznemu ograniczeniu homologicznej rekombinacji towarzyszy brak swobodnej segregacji chromosomów w pierścieniu, co skutkuje klonalnym (genetyczna jednorodność) i permanentnie heterozygotycznym statusem kolejnych pokoleń. Paradoksalnie więc, droga seksualna poprzez wygenerowanie licznych nasion, służy do szybkiej propagacji klonów, co przypomina apomiksję [16,18,24-26]. Liczne klony mogą dzięki temu szybko opanować dane siedlisko.

Fakt, że PTH powstała w niespokrewnionych taksonach roślinnych wskazuje, że system ten, mimo pewnych pozornie niekorzystnych cech (takich jak ograniczenie rekombinacji i różnorodności genetycznej w populacji, skomplikowany typ segregacji mejotycznej), może służyć jako owocna ewolucyjna strategia przystosowawcza, umożliwiająca zarówno uzyskiwanie nowych kombinacji cech, jak i sukces w szybkim opanowaniu nowych środowisk. Tak na przykład PTH u *Oenothera* poza kilkoma wyjątkami oparta jest na częstej autogamii, której generalnie sprzyja charakterystyczne dla systemu PTH, autogamiczna budowa kwiatów. Jednakże nadal możliwe jest zapylenie krzyżowe. Okazuje się, że w naturze różne linie/gatunki typu PTH, gdy ich zasięgi się zetkną, mogą się krzyżować. W ten sposób dochodzi do powstawania mieszańców, które są nowymi mikrogatunkami typu PTH [18]. Podczas aktu krzyżowania dochodzi do połączenia dwóch genetycznie odległych od siebie kompleksów Rennera i natychmiastowego utrwalenia nowej kombinacji cech, umożliwiającej nowemu klonalnie rozmnażającemu się mikrogatunkowi PTH szybkie (poprzez liczne nasiona) opanowanie nowej niszy. To sprawia, że formy PTH są inwazyjne. Tak więc, specyfika genetycznej zmienności w systemie PTH wydaje się polegać na tym, że jest ona generowana nie przez rekombinację, lecz przez hybrydyzację oraz translokację.

Ewolucja w kierunku PTH obejmuje ważny etap - proces powstawania dużych pierścieni mejotycznych. U *Oenothera* powszechnie przyjęty tradycyjny model [15,16], który zakłada powstawanie pierścieni mejotycznych na drodze przypadkowej hybrydyzacji pomiędzy populacjami różniącymi się chromosomowymi formułami (translokacjami). Sukcesywna ewolucja od populacji tworzących bivalenty do populacji tworzących pierścienie zachodzi dzięki przypadkowej akumulacji translokacji w populacjach. Jednakże model ten ma słabe punkty. Po pierwsze, biorąc pod uwagę przypadkowość translokacji i powszechną hybrydyzację, trudno jest wyjaśnić stałość kierunku ewolucyjnego w stronę powstawania coraz większych pierścieni (dyskusja w: [7]). Po drugie, tradycyjny model słabo koresponduje z genetyką populacyjną, zgodnie z którą selekcja przeciwko homozygotyczności jest mechanizmem napędowym ewolucji w kierunku PTH [27]. Istnieje więc u wiesiołka potrzeba wypracowania modelu ewolucji w kierunku PTH, który by z jednej strony uwzględniał wskazania genetyki populacyjnej, z drugiej strony na poziomie cytogenetycznym tłumaczył stabilność dużych pierścieni mejotycznych w populacjach. Wydaje się, że dla prób nakierowanych na ten cel, warto uwzględniać dane strukturalne, tzn. szczegóły organizacji chromosomów/chromatyny, które do tej pory były bardzo słabo poznane [15].

PTH jest zwykle tylko jedną ze strategii rozmnażania systemu translokacyjnego, w obrębie którego się rozwinął. Obok form PTH istnieją populacje różniące się translokacjami o zmiennym stopniu heterozygotyczności strukturalnej. Zwykle też istnieją linie całkowicie homozygotyczne, tzn. wytwarzające w mejozie same bivalenty [15,28]. Tradycyjnie uważa się, że formy PTH są skrajnie wyspecjalizowane i stanowią zwieńczenie ewolucji całego taksonu. Wyrazem tego jest uznanie *a priori*, że ograniczenie rekombinacji charakteryzuje tylko i wyłącznie formy PTH [21,24,25]. Jednak zarówno genetyka klasyczna, jak i molekularna nie potwierdzają tego założenia [15,23]. Badania molekularne wykorzystujące merkery AFLP wykazały że poziom rekombinacji genetycznej u uznanych ze formy ancestralne gatunków homozygotycznych, jest porównywalny z poziomem rekombinacji systemu PTH [23]. Tak więc zarówno u gatunków tworzących permanentne pierścienie

meiotyczne, jak i u badanych całkowitych strukturalnych homozygot, rekombinacja jest praktycznie niewykrywalna, ograniczona tylko do obligatoryjnie rekombinujących końców chromosomowych ramion. Ten fakt sugeruje, że do ograniczenia rekombinacji doszło zanim wyewoluowała PTH. Sugeruje się, że już w istniejącym wyjściowym (przed powstaniem PTH) systemie genetycznym (którego elementem są także strukturalne homozygoty) trudne w tej chwili do ustalenia chromosomowe rearanżacje (a więc niekoniecznie translokacje) doprowadziły do ograniczenia rekombinacji i w ten sposób ułatwiły/przyspieszyły ewolucję PTH [23]. Taka interpretacja jest wiarygodna w świetle ustaleń genetyków populacyjnych, którzy twierdzą, że oszacowany czas potrzebny do rozwoju PTH w oparciu o same translokacje, jest nierealistycznie długi [27]. Rearanżacjami chromosomowymi wyjątkowo dobrze tłumaczącymi zahamowanie crossing-over między kompleksami Rennera oraz tworzenie systemu genów letalnych, są inwersje [20,29].

Kondycja genetyczna systemu PTH jest interesująca także ze względu na fakt, że eliminacja homozygot bywa u form PTH sporadycznie przełamywana, doprowadzając w ten sposób do powstawania wtórnych homozygot z aletalnym kompleksem Rennera w dawce podwójnej [15,28]. Nieznany jest jego mechanizm oraz znaczenie tego zjawiska dla ewolucji całego systemu translokacyjnego. Mało wiadomo do jakiego typu zmian dochodzi w strukturze kompleksów Rennera na skutek tego procesu. Na przykład, u *Oenothera glazioviana* lamackiana przełamanie letalności zygotycznej jest związane ze słabo poznaną serią strukturalnych rearanżacji, w rezultacie czego powstaje kompleks aletalny, który po samozapyleniu daje całkowicie homozygotyczną (7 biwalentów) formę (mikrogatunek) *Oenothera glazioviana* blandina [15,28]. Także u *Tradescantia* w sekcji *Rhoeo*, niektóre homozygotyczne (sześć biwalentów w mejozie) klony wydają się reprezentować analogiczny fenomen [30]. Dotychczasowe badania nie dają jednak pewności co do tego, który z kompleksów jest obecny w dawce podwójnej jako kompleks aletalny. Nie wiadomo też jakie mechanizmy towarzyszą przełamaniu systemu letalności w sekcji *Rhoeo*.

Wiele na to wskazuje, że translokacje biorące udział w ewolucji systemu PTH, mogą przebiegać na różne sposoby, w zależności od taksonu. Tak na przykład u *Oenothera* (*Onagraceae*) do tej pory przeważał pogląd, że translokacje objęły swym zasięgiem całe ramiona chromosomowe [15], z kolei u *Gibasis pulchella* (*Commelinaceae*) postuluje się, że translokacje objęły niewielkie dystalne części chromosomowych ramion [12]. Generalnie jednak można stwierdzić, że charakter i zakres strukturalnych rearanżacji chromosomowych odpowiedzialnych za ewolucję PTH oraz podstawowe cytogenetyczne predyspozycje wymagane do rozwinięcia się tego systemu, są nieznanne. Podstawowym, warunkującym je parametrem jest struktura chromosomów/chromatyny. Niestety, jest ona niewystarczająco poznana u organizmów typu PTH.

Więcej informacji o *Oenothera*

Nazwa „*Oenothera*” lub „wiesiołek” (liczba chromosomów $2n=14$) została niniejszym użyta dla najlepiej poznanej podsekcji *Oenothera* (rodzaj *Oenothera* sekcja *Oenothera*, wg [16]). Wiesiołek pochodzi z Ameryki Środkowej i Północnej, skąd rozprzestrzenił się na resztę kontynentów. Został dobrze przebadany na gruncie morfologicznej taksonomii i genetyki klasycznej [15,28]. Dietrich ze współpracownikami [16], pogrupowali rozmaite linie w trzynaście gatunków. Cztery z nich tworzą głównie biwalenty w mejozie, natomiast pozostałe to formy PTH. Ponadto, w obrębie każdego gatunku istnieją różne linie translokacyjne. Można stwierdzić, że cały takson stanowi jeden duży system translokacyjny [15]. Oprócz tego, wiesiołek służy jako układ modelowy do badań nad kompleksowymi chromosomowymi rearanżacjami i PTH, jest także ważnym obiektem do badań nad rzadkim u roślin obuojcowskim przekazywaniem plastydów (ang. biparental plastid transmission) a także ma istotne znaczenie praktyczne. Wytwarzanym przez wiesiołki kwasem linolenowym (γ -linolenic acid, Omega-6) interesuje się przemysł odżywczy i medycyna, natomiast kultury tkankowe *Oenothera* są wykorzystywane do produkcji farmaceutycznie czynnych wtórnych metabolitów. W konsekwencji, obecnie jest zainteresowanie komercyjną propagacją wiesiołków i ich genetycznym udoskonalaniem (w: [22]). Rozpoznawanie mieszańców i kompleksów Rennera to warunek powodzenia w tej dziedzinie. Tak więc, badania cyto-molekularne nad strukturą chromosomów/chromatyny u wiesiołka mają nie tylko znaczenie teoretyczne.

Na podstawie obserwacji nad konfiguracjami w diakinezie u mieszańców, dla większości linii wiesiołków opracowano tzw. „formuły chromosomowe”, z których można wywnioskować iloma

translokacjami różnią się dane linie/gatunki [15]. Można także na ich podstawie przewidzieć jaka konfiguracja mejozyjna powstanie u mieszańca. Koniugujące w mejozie ramiona chromosomów przyjęto oznaczać arbitralnie cyframi. Uznano, że wzorcowym haploidalnym genomem odniesienia dla wszystkich wiesiołków będzie genom *Oe. elata* subsp. *hookeri* linia *hookeri* de Vries (7 biwalentów), gdzie każdy z siedmiu tworzących go chromosomów składa się z dwóch ramion oznaczonych arbitralnie w sposób następujący: 1·2, 3·4, 5·6, 7·8, 9·10, 11·12, 13·14. Z kolei formuła wydedukowana dla haploidalnego genomu tworzącego biwalenty *Oe. elata* subsp. *hookeri* linia *johansen* jest następująca: 1·2, 3·4, 5·6, 7·10, 9·8, 11·12, 13·14. Można zatem przez porównanie tych dwóch formuł wywnioskować, że finalnie te dwa wiesiołki różnią się jedną translokacją.

Na tle coraz liczniejszych genetycznych, ewolucyjnych i ekologicznych badań nad wiesiołkiem [22,23,25,26,31-39] i dobrze rozwiniętej genetyki klasycznej całej podsekcji [15], zdumiewający jest prawie zupełny brak podstawowych danych dotyczących struktury chromosomów. Do tej pory (to znaczy przed opublikowaniem wyników stanowiących osiągnięcie habilitacyjne) nie opracowano ani jednego kariotypu dla żadnego z gatunków wiesiołka. Nie przeprowadzono żadnej z dwóch podstawowych metod cytogenetycznych, tj. FISH i C-banding. Natura translokacji oraz cytogenetyczne predyspozycje, które pozwoliły zaadaptować translokacje jako stały element genetycznego systemu *Oenothera*, pozostają niewyjaśnione. Zgodnie z sugestiami Clelanda [15], taką predyspozycją u *Oenothera* są chromosomy metacentryczne – identyczne/podobne pod względem wielkości oraz podatna na pęknięcia centromerowa heterochromatyna. Tak więc według Clelanda, u wiesiołka translokują całe ramiona chromosomowe, a pęknięcia zlokalizowane są w obrębie heterochromatyny centromerowej – w bliskim sąsiedztwie centromerów. Ta hipoteza została zaproponowana w oparciu o obserwacje klasycznie wybarwionych chromosomów, które rzeczywiście okazały się być metacentryczne i bardzo do siebie podobne pod względem długości. Jednak dystrybucję heterochromatyny oszacowano nie na podstawie metod specyficznych (np. C-banding), lecz w oparciu o obserwacje klasycznie zabarwionych kondensujących chromosomów. Uderzającą cechą wiesiołka jest bowiem nierówna kondensacja chromatyny w czasie podziałów komórkowych. Części dystalne klasycznie wybarwionych chromosomów często aż do metafazy wykazują znacznie opóźnioną kondensację w porównaniu do części przycentromerowych które osiągają do tego czasu maksymalny stopień zgrubienia. Taki wzór kondensacji nie jest powszechny u roślin, jest jednak typowy dla *Onagraceae* [19]. Generalnie, istnieje tendencja aby utożsamiać mocno skondensowane (a przez to silniej barwiące się) środkowe części chromosomów wiesiołka z heterochromatyną konstytutywną [15], co zdaje się potwierdzać hipotezę Clelanda. Jednak istniejące dane wskazują wyraźnie że na podstawie wzoru kondensacji chromosomów nie można wnioskować o lokalizacji heterochromatyny i że jedyną do tego drogę stanowi zastosowanie metod specyficznych, np. metody C-banding [40].

Więcej informacji o sekcji *Rhoeo* (rodzaj *Tradescantia*)

PTH w rodzaju *Tradescantia* (rodzina *Commelinaceae*) rozwinęła się u gatunku *T. spathacea* (synon. *Rhoeo spathacea*, liczba chromosomów $2n=12$), który jest jednocześnie jedną z dwunastu wyróżnionych sekcji [41,42]. Uzasadnieniem dla utworzenia osobnej sekcji dla tego gatunku, jest nie tylko fakt występowania w jej obrębie systemu PTH, lecz także badania molekularne, które dowodzą że jest on w istocie osobnym kładem [43]. Wszystkie dwanaście chromosomów u *T. spathacea* biorą udział w tworzeniu mejozyjnego pierścienia zarówno w szlaku męskim jak i żeńskim. Badania sugerują, że u *T. spathacea* mechanizmem utrzymującym stan permanentnej heterozygotyczności jest letalność homozygotycznych zygot/zarodków [44]. Ojczyzną tego gatunku jest Ameryka Środkowa (Meksyk), skąd rozprzestrzenił się na inne ciepłe rejony. W hodowli doniczkowej uprawiony jest na całym świecie jako roślina domowa/ozdobna. Istnieją trzy odmiany *T. spathacea*: *spathacea* (syn. *discolor*), *variegata* (synon. *vittata*) i *concolor* - różniące się morfologią liści [45]. Sekcja *Rhoeo* jest wyjątkowa na tle innych systemów PTH, ponieważ jest nie tylko monotypowa i jednolita, lecz także najprawdopodobniej pozbawiona translokacyjnego polimorfizmu [45]. Formowanie się permanentnego dwunastochromosomowego pierścienia w mejozie odnotowano u odmian *spathacea* i *variegata*, i w niektórych klonach odmiany *concolor*. W odróżnieniu od *Oenothera*, w sekcji *Rhoeo* utrzymał się literowy system oznaczania koniugujących ze sobą ramion chromosomowych. Pełna sekwencja chromosomów w pierścieniu u odmiany *spathacea* została zakodowana literowo przez Saxa

[46] w następujący sposób: - Aa - aB - Bb - bC - Cc - cD - Dd - dE - Ee - eF - Ff - fA -. Założono arbitralnie, że chromosomy: Aa, Bb, Cc, Dd, Ee, fF tworzą kompleks α , natomiast chromosomy: aB, bC, cD, dE, eF, fA tworzą kompleks β [47]. Sax [46] podał pierwszą wiarygodną informację o morfologii chromosomów mejotycznych u odmiany *spathacea* i określił po raz pierwszy stałą sekwencję ośmiu chromosomów w pierścieniu. Wyróżnił w pierścieniu chromosomy heterochrachialne (h), czyli chromosomy aB, Bb, Cc, cD, dE, Ee oraz pozostałe chromosomy, których morfologicznie określił jako izochrachialne (i). Generalna dystrybucja C-pozytywnej (barwiącej się metodą prążków C) heterochromatyny konstytutywnej u odmiany *spathacea* została poznana. Wiadomo, że heterochromatyna konstytutywna występuje w rejonach przycentromerowych wszystkich dwunastu chromosomów, w kilku pozycjach terminalnych, w formie NOR-heterochromatyny, oraz że nie ma jej w pozycjach interkalarnych [48-50]. Wiadomo też, że przycentromerowa heterochromatyna u tej odmiany agreguje w jądrach komórek mejotycznych i somatycznych i tworzy kolektywne chromocentry [48,49,51].

Ze względu na morfologiczne podobieństwo wielu chromosomów w mitozie, identyfikacja chromosomów u *Rhoeo* była do niedawna możliwa tylko w mejotycznym pierścieniu (ponieważ charakteryzuje się on stałością wzajemnego ułożenia chromosomów). Ponieważ chromosomy mejotyczne nie są dogodnym obiektem do zaawansowanych badań, istnieje konieczność opracowania systemu identyfikacji chromosomów w mitozie. W oparciu o technikę C-banding, u odmiany *spathacea* dokonano generalnej, statystycznej identyfikacji chromosomowych typów w mitozie [48,49]. Niestety, metoda C-banding silnie degraduje chromatynę, powodując przy tym istotne zmiany morfologii chromosomów [52]. Stąd też potrzeba opracowania mniej destrukcyjnych, fluorescencyjnych metod różnicowego barwienia dla sekcji *Rhoeo*. Przede wszystkim jednak, do zaawansowanych badań nad strukturą nerekombinujących kompleksów Rennera w sekcji *Rhoeo* konieczne jest opracowanie metody FISH, która przy sprzyjającym układzie markerów cytomolekularnych pozwalałaby na szybką i pewną identyfikację chromosomów i chromosomowych ramion w konkretnej płytce mitotycznej. Aby podjąć wiążącą dyskusję na temat charakteru i zakresu translokacji, powinny zostać opracowane precyzyjne tabelaryczne zestawienia uśrednionych długości chromosomów. Konieczne jest też oszacowanie statystycznych różnic w długości pomiędzy koniugującymi w mejozie ramionami chromosomów. Istnieje też konieczność, aby dokonać zaawansowanej analizy kariotypu także u pozostałych odmian.

Cel naukowy i strategia badawcza

Opisane poniżej badania miały na celu głębszy niż do tej pory wgląd w cytogenetyczne podłoże (struktura chromosomów/chromatyny interfazowej) i przyczyny translokacyjnej heterozygotyczności u *Oenothera* i *Tradescantia*, głównie przy pomocy takich technik cytogenetycznych, których do tej pory generalnie nie stosowano do badań nad w/w taksonami. Mimo że systemy PTH w obydwu taksonach mają duże znaczenie ogólnobiologiczne jako układy modelowe i są przedstawiane w znanych i klasycznych opracowaniach jako podręcznikowe przykłady translokacyjnej heterozygotyczności [8,9,15,28,53-63], dotychczasowa wiedza o strukturze ich kariotypów, chromatyny, charakterze i zakresie chromosomowych rearanżacji jest niewielka i niewystarczająca. *Oenothera* i *Tradescantia* reprezentują dwie różne grupy roślin - rośliny dwuliścienne vs. jednoliścienne. Taki wybór materiału badawczego był od samego początku podyktowany potrzebą wykrycia szczegółów organizacji chromatyny/chromosomów, które byłyby uwarunkowane nie pokrewieństwem, lecz wymogami narzuconymi przez PTH.

Dla rozwoju PTH pierwszorzędową rolę odgrywają rearanżacje chromosomowe. PTH, jeżeli się rozwija, to zwykle w obrębie taksonu stanowiącego system translokacyjny, tzn., który nie tylko wykazuje szczególną skłonność do translokacji, ale przede wszystkim potrafi zaadaptować je i wchłonąć jako istotną część swojego systemu genetycznego i reprodukcyjnego [16,18,19]. Ponadto, wiele na to wskazuje, że, charakterystyczne dla danego taksonu (więc nie tylko dla form PTH) pierwotne chromosomowe rearanżacje inne niż translokacje, przyczyniły się do powstania PTH [23]. Stąd też istnieje konieczność, aby w badaniach nad PTH analizować nie tylko formy PTH lecz także innych wybranych przedstawicieli danego taksonu. Kolejnym argumentem za koniecznością rozszerzenia badań o formy spokrewnione, lecz nie należące do systemu PTH, jest wspomniane wyżej

powstawanie wtórnych homozygot z form PTH. Zgodnie z powyższym, oprócz heterozygot translokacyjnych przebadano wybrane homozygotyczne linie oraz poddano analizie gatunek *Tradescantia virginiana*. Cenną informacją, jaką się kierowałem przy wyborze tego ostatniego, były obserwacje klasycznych cytologów, wskazujące, że typowa dla trzykrotek skłonność do fragmentacji chromosomów, która przyczynia się do powstawania B-chromosomów [29,64-73], jest u *T. virginiana* nasiloną [64,65,70]. Fragmentacja chromosomów powoduje strukturalną heterozygotyczność, lecz przede wszystkim jest skutkiem chromosomowych rearanżacji. W przypadku *Tradescantia*, daje więc ona możliwość wnioskowania o charakterze pierwotnych zmian chromosomowych.

Opisane poniżej wyniki zostały uzyskane przy użyciu technik cytogenetycznych generalnie wcześniej nie stosowanych w badaniach nad chromosomami/chromatyną u *Tradescantia* i *Oenothera*. Do metod tych należą m.in.: fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH), immunodetekcja potranslacyjnych epigenetycznych modyfikacji chromatyny, fluorescencyjne barwienia różnicowe. W przypadku chromosomów wiesiołka, po raz pierwszy zastosowano także metodę C-banding (prażki C). Tak więc omawione naukowe osiągnięcie (cykl 7 prac) przedstawia oryginalny i istotny typ badań cytogenetycznych.

Prace stanowiące osiągnięcie naukowe - cel, materiał, metody, wyniki i wnioski.

[1]

.....

[1] Golczyk H., Hasterok R., Joachimiak A.J. 2005. FISH-aimed karyotyping and characterization of Renner complexes in permanent heterozygote *Rhoeo spathacea*. *Genome* 48: 145-153.

.....

- Główne cele pracy:

- Zmapowanie po raz pierwszy rybosomalnego DNA (45S i 5S rDNA) na chromosomach mejotycznych i mitotycznych u odmiany *spathacea* oraz wsparcie tych badań analizą rozmieszczenia organizatorów jąderkotwórczych (NOR). Sprawdzenie przy pomocy techniki FISH, czy zakończenia chromosomów są zbudowane z kanonicznych minisatelitarnych powtórek typu *Arabidopsis*.
- Stworzenie po raz pierwszy niezawodnego systemu identyfikacji chromosomów i ich ramion, w oparciu o rozłożenie cytomolekularnych markerów FISH oraz morfologię chromosomów. Przypisanie zidentyfikowanym chromosomom kodów literowych Saxa (1931).
- Analiza struktury jąder interfazowych merystemu korzenia przy użyciu metod cytomolekularnych..

- Materiał roślinny:

- Trzy klony tworzącej 12-chromosomowe pierścienie mejotyczne permanentnej heterozygoty translokacyjnej *T. spathacea* (syn. *Rhoeo spathacea*) var. *spathacea* ($2n=2x=12$). Analizowane były chromosomy mitotyczne i mejotyczne, jądra interfazowe i profazowe merystemu korzenia. Badania prowadzono na poziomie mikroskopii fluorescencyjnej i w jasnym polu.

- Stosowane metody:

- Po raz pierwszy u *T. spathacea* zastosowano fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (FISH) w mejozie i mitozie z udziałem wybranych sond molekularnych (fragment 45S rDNA, fragment 5S rDNA, sonda telomerowa HT100.3 typu *Arabidopsis*).
- Metoda Ag-staing (ujawniająca aktywność transkrypcyjną 45S rDNA, czyli organizatory jąderkotwórcze)
- Barwienie klasyczne (orceina octowa)
- Akwizycja obrazu mikroskopowego przy pomocy kamery CCD i oprogramowania.

- Uzyskane wyniki:

- Ustalono które chromosomy meiotyczne odpowiadają kodom literowym Saxa [46], oznaczono je dodatkowo cyframi oraz określono ich ogólną morfologię: 1Aa(i) - 2aB(h) - 3Bb(h) - 4bC(i) - 5Cc(h) - 6cD(h) - 7Dd(i) - 8dE(h) - 9Ee(h) - 10eF(i) - 11Ff(i) - 12fA(i). Opisano morfologię wszystkich chromosomów w pierścieniu. Wykazano, że kolejność wszystkich chromosomów w pierścieniu jest stała dla każdego z trzech analizowanych klonów.
- Stwierdzono, że wszystkie chromosomy heterobrachialne w pierścieniu koniugują ze sobą za pośrednictwem swoich krótszych ramion u wszystkich trzech klonów.
- Stwierdzono, że w kariotypie występuje 10 terminalnych, transkrypcyjnie aktywnych loci 45S rDNA oraz 8 loci 5S rDNA.
- Stwierdzono, że maksymalna liczba jąderek w jądrach merystemu korzenia wynosi 8 i nie pokrywa się z liczbą transkrypcyjnie aktywnych terminalnych loci 45S rDNA (10). Powodem tej niezgodności jest silna tendencja do fuzji telomerów i jąderek.
- Ustalono system szybkiej identyfikacji każdego chromosomu w mitozie w oparciu rozłożenie loci 5S i 45S rDNA, chromosomową morfologię oraz orientacyjną wielkość przycentromerowej AT-bogatej (DAPI-pozytywnej) heterochromatyny w niektórych chromosomach.
- Stwierdzono, że zakończenia chromosomów są zbudowane z kanonicznych minisatelitarnych powtórek typu *Arabidopsis*.
- Ustalono, że jądra interfazowe i profazowe merystemu korzenia u wszystkich trzech klonów charakteryzują się silnym spolaryzowanym Rablowskim układem. Stwierdzono, że w ramach układu Rablowskiego dochodzi do agregacji nie tylko pericentromerycznej heterochromatyny, lecz także do fuzji telomerów i terminalnych jąderek.

- Wnioski:

- Opracowanie systemu identyfikacji chromosomów w mitozie u *T. spathacea* ma szczególne znaczenie, gdyż od tej pory można zgłębiać strukturę chromosomów tego gatunku w oparciu o łatwiejsze do analizy stadium mitotyczne.
- Koniugowanie chromosomów heterobrachialnych za pośrednictwem ramion o zbliżonej długości, brak heterochromatyny interkalarniej oraz zróżnicowana wielkość heterochromatynowych segmentów przycentromerowych mogą wstępnie sugerować że punkty translokacyjne powstawały w obrębie przycentromerowej heterochromatyny, a więc, że w translokacjach brały udział ramiona chromosomowe.
- Zaproponowano, że zorganizowany układ chromatynowych domen w postaci układu Rablowskiego ma związek z kompleksowymi chromosomowymi rearanżacjami u *Rhoeo*. Agregacja pericentromerycznej heterochromatyny, fuzja telomerów i terminalnych jąderek wydają się prostym sposobem na utrzymanie/wzmocnienie spolaryzowanej architektury jądrowej.

[2]

.....

[2] Golczyk H., Joachimiak A., Hasterok R. 2008. Pericentromeric GC-rich chromatin in *Rhoeo*. Evidence from soma and germ-line. *Caryologia* 61: 388-391.

.....

- **Główne cele pracy:**

- Opracowanie metody fluorescencyjnego barwienia CMA₃/DAPI/DA do wizualizacji GC-bogatej frakcji chromatyny u odmiany *spathacea*. Przetestowanie nowej metody na materiale mejotycznym i mitotycznym.

- **Materiał roślinny:**

- Trzy analizowane w poprzedniej pracy klony odmiany *spathacea*. Analizowane były chromosomy mitotyczne i mejotyczne oraz jądra mejocytów. Badania prowadzono na poziomie mikroskopii fluorescencyjnej.

- **Stosowane metody:**

- Po raz pierwszy zastosowano u *T. spathacea* barwienie CMA₃/DAPI/DA – wykrywające specyficznie GC-bogate chromatynowe segmenty.
- Akwizycja obrazu mikroskopowego przy pomocy kamery CCD i oprogramowania.

- **Uzyskane wyniki:**

- Po raz pierwszy wykazano, że u odmiany *spathacea*, rejony przycentromerowe wszystkich chromosomów (w mitozie i mejozie) składają się nie tylko z chromatyny AT-bogatej (barwienie DAPI), lecz także z chromatynowych frakcji bogatej w GC.
- Mejotyczne jądra profazowe wykazywały obecność 8-10 GC-bogatej frakcji w obrębie pojedynczego kolektywnego chromocentru. Wielkość niektórych GC-bogatej frakcji sugeruje tendencję do asocjacji pomiędzy GC-bogatymi frakcjami przycentromerowymi.

- **Wnioski:**

- Obecność zarówno AT- jak i GC-bogatej frakcji w rejonach przycentromerowych u odmiany *spathacea* może sugerować zakrojone na szeroką skalę (koncertowe) rozprzestrzenianie się sekwencji przycentromerowych i homogenizację tych sekwencji podczas ewolucji kariotypu. Konieczne jest zatem w kolejnych badaniach [3,4,5] sprawdzenie, czy taka budowa przycentromerowych rejonów charakteryzuje także pozostałe odmiany *T. spathacea*. Wskazane jest także poznanie dokładnej wzajemnej lokalizacji AT- i GC-bogatej frakcji przycentromerowych.
- Fakt, że u odmiany *spathacea* istnieje skłonność do silnych asocjacji przycentromerowych (kolektywne chromocentry) w mitozie i mejozie (patrz Wstęp), uzyskuje nowe znaczenie w świetle niniejszych badań. Zaproponowano, że asocjacje te mogły zapewniać zarówno rozprzestrzenianie się sekwencji przycentromerowych na drodze kontaktu, jak i wzajemne translokacje całych, bądź też całych ramion chromosomowych.
- Ponieważ GC-bogata chromatyna w innych roślin zwykle kolokalizuje z genami 45S rRNA, można podejrzewać, że w rejonach przycentromerowych znajduje się rDNA - być może rozproszone i trudne do wykrycia metodą FISH. Wskazana jest zatem w kolejnych badaniach [3,4] modyfikacja metody FISH, zwiększająca jej czułość oraz opracowanie metody

pozwalającej na sekwencyjne zastosowanie FISH i AT-/GC-specyficznych różnicowych barwień fluorescencyjnych na tym samym preparacie.

[3] i [4]

.....
[3] Golczyk H., Hasterok R., Szklarczyk M. 2010. Ribosomal DNA, tri- and bipartite pericentromeres in the permanent translocation heterozygote *Rhoeo spathacea*. *Cellular & Molecular Biology Letters* 15: 651-664.

[4] Golczyk H. 2011. Cytogenetics of the permanent translocation heterozygote *Rhoeo spathacea* var. *variegata*. Implications for complex chromosome rearrangements in *Rhoeo*. *Caryologia* 64: 325-334.
.....

- **Główne cele pracy:**

- Zastosowanie sekwencyjnej kombinacji metody FISH z metodami fluorescencyjnego różnicowego barwienia: CMA₃/DAPI/DA (GC-bogata chromatyna) i DAPI/AMD (AT-bogata chromatyna) w celu lepszego poznania wzajemnej lokalizacji AT- i GC-bogatych przycentromerowych frakcji.
- Zastosowanie ulepszonej metody FISH o podniesionej czułości w celu sprawdzenia, czy u dwóch odmian PTH w rejonach przycentromerowych znajduje się rDNA i sekwencyjna kombinacja tej metody z różnicowymi barwieniami fluorescencyjnymi CMA₃/DAPI/DA i DAPI/AMD.
- Na podstawie istniejącego już systemu identyfikacji chromosomowych ramion w mitozie [1] - opracowanie precyzyjnych tabelarycznych zestawień uśrednionych długości chromosomów i ich ramion oraz różnic w długościach koniugujących ramion w pierścieniu mejotycznym.

- **Materiał roślinny:**

- Trzy analizowane w poprzedniej pracy klonu *T. spathacea* odmiana *spathacea* [3] oraz trzy różne klonu *T. spathacea* odmiana *variegata* [4]. Obydwie odmiany są formami PTH i tworzą 12-chromosomowe pierścienie mejotyczne. Analizowane były chromosomy mitotyczne i mejotyczne, jądra mejocytów i merystemu korzenia. Badania prowadzono na poziomie mikroskopii fluorescencyjnej.

- **Stosowane metody:**

- Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH) z udziałem wybranych sond molekularnych: fragment 45S rDNA, fragment 5S rDNA. Zwiększono czułość techniki poprzez wprowadzenie trawienia preparatów roztworem pepsyny (lepsza penetracja sondy) przed hybrydyzacją. Stosowano FISH w warunkach standardowej lub obniżonej siły płukań (stringency).
- Fluorescencyjne barwienie DAPI/AMD – wykrywające specyficznie AT-bogate chromatynowe segmenty oraz jego sekwencyjna kombinacja z techniką FISH.
- Fluorescencyjne barwienie CMA₃/DAPI/DA – wykrywające specyficznie GC-bogate chromatynowe segmenty oraz jego sekwencyjna kombinacja z techniką FISH.
- Komputerowa analiza kariotypu (pomiar chromosomowe, ustalenie statystycznej długości chromosomowych ramion oraz statystycznych różnic w długości pomiędzy koniugującymi ramionami).
- Akwizycja obrazu mikroskopowego przy pomocy kamery CCD i oprogramowania.
- Test studenta.

- Uzyskane wyniki:

- Ustalono że chromosomy u odmiany variegata tworzą w meiotycznym pierścieniu taką samą sekwencję typów morfologicznych jak u odmiany *spathacea*: 1Aa(i) - 2aB(h) - 3Bb(h) - 4bC(i) - 5Cc(h) - 6cD(h) - 7Dd(i) - 8dE(h) - 9Ee(h) - 10eF(i) - 11Ff(i) - 12fA(i).
- Obie odmiany nie różnią się rozłożeniem loci 5SrDNA i 45S rDNA na chromosomach. Dzięki ulepszonej metodzie FISH wykryto w mejozie i mitozie nowe interkalarne loci 5S rDNA na ramionach 3b i 4b, obydwa w odległości ok. 40% długości każdego z ramion (licząc od telomeru). Odkryto też, że każde z dwóch dużych loci 5S rDNA zlokalizowanych na ramionach 8E i 9E jest złożone z dwóch mniejszych loci.
- Dzięki ulepszeniu techniki FISH, u obu odmian stwierdzono obecność genów 45S rRNA w obrębie rejonów przycentromerowych we wszystkich dwunastu chromosomach w mejozie. Przycentromerowe sygnały 45S rDNA nie były jednak widoczne, gdy tą samą metodą traktowano preparaty mitotyczne (merystem korzenia). Obniżenie siły płukań (stringency) pozwoliło na wizualizację przycentromerowych genów 45S rRNA na chromosomach mitotycznych.
- Zastosowanie techniki Ag-staining u odmiany variegata pozwoliło stwierdzić, że podobnie jak u odmiany *spathacea*, terminalne loci 45S rDNA są aktywne transkrypcyjnie, natomiast przycentromerowe geny 45S rRNA są nieaktywne. U odmiany variegata, w przeciwieństwie do odmiany *spathacea* (8 jęderek – patrz [1]) maksymalna liczba jęderek wynosiła 10, a zatem odpowiadała liczbie terminalnych loci 45S rDNA.
- Fluorescencyjne barwienia różnicowe (DAPI/AMD i CMA₃/DAPI/DA) ujawniły, że u obu odmian rejony przycentromerowe wszystkich chromosomów w kariotypie składają się z większej centralnej AT-bogatej domeny heterochromatynowej oraz z jednego bądź dwóch bocznie przylegających mniejszych GC-bogatych segmentów. Dzięki zastosowaniu metody sekwencyjnej rDNA-FISH-CMA₃/DA/DAPI i rDNA-FISH-DAPI/AMD, udało się zmapować AT i GC bogatą chromatynę przycentromerową na każdym zidentyfikowanym chromosomie w relacji do przycentromerowych sygnałów 45S rDNA. Przycentromerowe sygnały 45S rDNA wyraźnie kolokalizują z przycentromerowymi GC-bogatymi segmentami, lecz nie ograniczają się do nich. Bardzo drobne sygnały 45S rDNA występują bowiem rozproszone w obrębie całych rejonów przycentromerowych, a więc także ich AT-bogatych części. Wielkość sygnałów fluorescencyjnych nie zawsze koreluje z wielkością GC-bogatych segmentów. Czasami duże segmenty GC-bogatej chromatyny wykazują słabe sygnały hybrydyzacyjne 45S rDNA.
- Obliczono, że całkowita ilość AT-bogatej heterochromatyny u obu odmian wynosi ok. 8% długości kariotypu.
- Podano dla obu odmian długości każdego z 24 chromosomowych ramion (w tabelach). Analiza wykazała że w systemie PTH w sekcji *Rhoeo*, połowa chromosomów w kariotypie ma jedno ramię znacznie krótsze od drugiego ramienia oraz ustalono dokładnie które chromosomy i w jakim stopniu różnią się od siebie pod względem długości. Ustalono też po raz pierwszy w sposób bardzo dokładny (uśrednione pomiary) i z użyciem testu statystycznego, które z koniugujących ze sobą ramion chromosomowych różnią się istotnie pod względem długości. Generalnie u obu odmian koniugujące ze sobą ramiona są mniej lub bardziej dopasowane pod względem długości. Najbardziej dopasowane są krótsze ramiona 2B-3B, 5c-6c, 8E-9E, 11f-12f. Zupełnie niedopasowane są ramiona 4C-5C oraz 6D-7D (największe różnice w długości). Precyzyjnie skalkulowana suma wszystkich „niedopasowań” u obu odmian nie jest duża i wynosi ok. 6% długości kariotypu.
- Zastosowanie metody DAPI/AMD ujawniło, że jądra komórek somatycznych i meiotycznych u odmiany variegata charakteryzują się silnie spolaryzowaną architekturą, polegającą na tym, że rejony przycentromerowe wszystkich dwunastu chromosomów agregują/fuzują po jednej stronie jąder, co manifestuje się w postaci kilku jednego lub kilku AT-bogatych kolektywnych

chromocentrow. Organizacją jąder somatycznych i mejotycznych u odmiany variegata jest więc generalnie taka sama jak u odmiany spathacea.

- **Wnioski:**

- Już na samym wstępie dyskusji można stwierdzić, że ponieważ u obu odmian występują centromerowe bloki AT-bogatej heterochromatyny konstytutywnej oraz brak jest heterochromatyny interkalarniej, pęknięcia translokacyjne w okolicach centromeru oraz rearanżacje całych chromosomowych ramion (jako podstawa powstawania pierścienia mejotycznego w sekcji *Rhoeo*) to istotnie prawdopodobny scenariusz ewolucyjnych wydarzeń w sekcji *Rhoeo*. Pogłębiona analiza jeszcze bardziej o tym przekonuje i daje więcej szczegółowych przesłanek: Całkowita suma "niedopasowań na długość" koniugujących ze sobą chromosomowych ramion wynosi ok. 6% długości kariotypu, a więc jest generalnie zbliżona do ilości AT-bogatej przycentromerowej heterochromatyny (wynoszącej ok. 8% długości kariotypu), lecz jej nie przekracza. To wskazuje, że niedopasowania powstały dlatego, że pęknięcia translokacyjne zachodziły w obrębie lub w pobliżu AT-bogatej przycentromerowej heterochromatyny, lecz w trochę różnych odległościach od centromeru.
- Zaproponowano, że źródłem rDNA przycentromerowego były subtelomeryczne sekwencje 45S rDNA, które zasiedliły rejony przycentromerowe, między innymi dzięki inwersjom paracentrycznym ramion chromosomowych. Proponowane przypuszczalne miejsca pęknięć są więc zlokalizowane w obrębie rejonów przycentromerowych oraz w obrębie subtelomerycznych loci 45S rDNA.
- Obecność zarówno GC- jak i AT-bogatych grup sekwencji przycentromerowych w każdym z 12 chromosomów sugeruje, że w sekcji *Rhoeo* dochodzi do homogenizacji rejonów przycentromerowych na chromosomach niehomologicznych. W sekcji *Rhoeo* istnieje szczególnie strukturalne uwarunkowanie do takiego zjawiska. Jest nim specyficzna architektura jąder komórkowych. Badania wykazały bowiem, że u obu odmian w jądrach komórek somatycznych i mejotycznych rejony przycentromerowe wszystkich dwunastu chromosomów biorą udział w tworzeniu się układu Rablowskiego i agregują po jednej stronie jądra (naprzeciwko bieguna telomerycznego) tworząc jeden duży chromocentr kolektywny. Tak więc fizyczna bliskość i kontakt domen przycentromerowych mogły być dogodnym podłożem dla wspólniania się sekwencji przycentromerowych u *Rhoeo*. Pewna grupa subtelomerycznych sekwencji (np. GC-bogatych) raz dostawszy się w okolicę centromeru na danym chromosomie (np. poprzez inwersję paracentryczną), mogła się wraz z przylegającymi do nich, już istniejącymi tam innymi sekwencjami (np. AT-bogatymi) znaleźć w odcinku przycentromerowym innego chromosomu i w ten sposób dokonać koncertowej inwazji (poprzez pęknięcia w rejonach przycentromerowych oraz wzajemne translokacje całych ramion) także na pozostałe chromosomy.
- W sekcji *Rhoeo* mogło dochodzić także do inwersji paracentrycznych obejmujących nie ramiona chromosomowe, lecz ich części. Inwersje paracentryczne mają tą zaletę, że nie zmieniają morfologii chromosomów (więc nie wprowadzają niekorzystnych zmian we wzajemnych dopasowaniu na długość koniugujących ramion chromosomowych) oraz doskonale tłumaczą zahamowanie crossing-over między kompleksami Rennera oraz tworzenie się systemu genów letalnych (Darlington 1929, 1931; Swanson 1940). Zaproponowano, że duplikacja loci 5S rDNA na ramionach 8E i 9E jest rezultatem niewielkiej inwersji paracentrycznej a jedno z pęknięć inwersyjnych znajdowało się w obrębie już istniejącego wyjściowego locus 5S rDNA. Z kolei małe interkalarne loci 5S rDNA na ramionach 3b i 4b mogły powstać na skutek dużej inwersji (obejmującej ok. 40% ramienia) i pęknięcia inwersyjnego w obrębie dużego terminalnego locus 5S rDNA. Ponieważ zaproponowane interkalarne inwersje występują w stanie homozygotycznym (na koniugujących ze sobą ramionach w pierścieniu mejotycznym), zatem musiało do nich dojść wcześniej niż do translokacji chromosomowych ramion.

[5]

-
- [5] Golczyk H. 2011. Breakdown of the balanced lethals in *Rhoeo*. The structure of the alethal Renner complex of the homozygotic stock of *Rhoeo*. *Cytogenetic and Genome Research* 134: 229-233.
-

- **Główne cele pracy:**

- Ustalenie typu konfiguracji mejotycznej w mejozie u odmiany concolor.
- Zastosowanie ulepszonej metody FISH oraz metod fluorescencyjnego różnicowego barwienia (CMA₃/DAPI/DA i DAPI/AMD), C-banding, Ag-staining, w celu poznania struktury kariotypu odmiany concolor.
- Opracowanie precyzyjnych tabelarycznych zestawień uśrednionych długości chromosomów i ich ramion.

- **Materiał roślinny:**

- Odmiana *T. spathacea* var. concolor. Analizowane były chromosomy mitotyczne i mejotyczne, jądra merystemu korzenia. Badania prowadzono na poziomie mikroskopii fluorescencyjnej i w jasnym polu.

- **Stosowane metody:**

- Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH) z udziałem wybranych sond molekularnych (fragment 45S rDNA, fragment 5S rDNA). Technika ulepszona poprzez wprowadzenie trawienia preparatów roztworem pepsyny przed hybrydyzacją. Stosowano FISH w warunkach standardowej lub obniżonej siły płukań (stringency).
- Fluorescencyjne barwienie różnicowe DAPI/AMD – wykrywające specyficjnie AT-bogate chromatynowe segmenty.
- Fluorescencyjne barwienie różnicowe CMA₃/DAPI/DA – wykrywające specyficjnie GC-bogate chromatynowe segmenty.
- Klasyczna metoda prążków C (Giemsa C-banding)
- Metoda Ag-staining (srebrzenie)
- Barwienie orceiną octową
- Komputerowa analiza kariotypu (pomiar chromosomowe).
- Akwizycja obrazu mikroskopowego przy pomocy kamery CCD i oprogramowania.

- **Uzyskane wyniki:**

- Wykazano obecność 6 bivalentów w mejozie u odmiany concolor.
- Chromosomy podstawowego kompleksu odmiany concolor są morfologicznie identyczne z chromosomami kompleksu β , który występuje u form PTH. Są to chromosomy: 2aB(h) - 4bC(i) - 6cD(h) - 8dE(h) - 10eF(i) - 12fA(i). Kompleks odmiany concolor został więc nazwany $^h\beta$.
- Rozkład dystalnych i interkalarnych loci 5S i 45S rDNA w kompleksie $^h\beta$ jest generalnie prawie taki sam jak w kompleksie β . Różnice są niewielkie: m.in. brak dystalnych loci 45S

rDNA na chromosomie 10, dodatkowy mały locus na krótszym ramieniu chromosomu 12 w kompleksie $^h\beta$.

- Kompleks $^h\beta$, tak samo jak kompleks β wykazuje obecność heterochromatyny w rejonach przycentromerowych wszystkich chromosomów.
- Podobnie jak w kompleksie β , rejony przycentromerowe chromosomów kompleksu $^h\beta$ składają się z AT- i GC-bogatej frakcji chromatynowych.
- W kompleksie $^h\beta$ tak samo jak w kompleksie β , geny 45S rRNA są obecne w rejonach przycentromerowych wszystkich chromosomów. Podobnie jak u odmian PTH, metoda Ag-staining wykazała, że są one nieaktywne, w odróżnieniu od terminalnych genów 45S rDNA.
- Chromosomy 2, 6, 12 kompleksu $^h\beta$ mają mniej AT-bogatej heterochromatyny przycentromerowej niż chromosomy 2, 6, 12 kompleksu β .

- Wnioski:

- Wyniki uzyskane wskazują że mimo niewielkich modyfikacji w ułożeniu niektórych dystalnych loci 45S rDNA i w ilości heterochromatyny na niektórych chromosomach, kompleks $^h\beta$ jest segmentalnie nie zmienionym kompleksem β . Odmiana concolor najprawdopodobniej więc powstała z formy PTH poprzez przełamanie systemu letalności. A zatem, w przeciwieństwie do *Oenothera* (patrz wyżej), powstawanie kompleksu aletalnego w sekcji *Rhoeo* może odbyć się bez gruntownych zmian strukturalnych. Zaproponowano, że aletalny kompleks $^h\beta$ może powstać z kompleksu β na skutek sporadycznego crossing-over pomiędzy genami letalnymi usytuowanymi na koniugujących ze sobą homologicznych częściach ramion chromosomowych.

[6]

.....

[6] Golczyk H. 2011. Structural heterozygosity, duplication of telomeric (TTAGGG)_n clusters and B chromosome architecture in *Tradescantia virginiana* L. *Cytogenetic and Genome Research* 134: 234-242.

.....

- Główne cele pracy:

- Sprawdzenie konfiguracji meiotycznych w celu ustalenia czy badane rośliny są translokacyjnymi heterozygotami (pierścienie translokacyjne w mejozie) czy też nie.
- Cyto-molekularna analiza struktury kariotypu w celu sprawdzenia czy cechy charakterystyczne dla *T. spathacea* (takie jak obecność konstytutywnej heterochromatyny i genów 45 rRNA w rejonach przycentromerowych, terminalnie zlokalizowane organizatory jąderka, telomery typu *Arabidopsis*, itp.) są także obecne u *T. virginiana*.
- Próba odpowiedzi na pytanie, jakie chromosomowe rearanżacje powodują fragmentację chromosomów oraz strukturalną heterozygotyczność u *T. virginiana*.

- Materiał roślinny:

- trzy klony *Tradescantia virginiana* (2n-4x=24). Analizowane były chromosomy mitotyczne i meiotyczne. Badania prowadzono na poziomie mikroskopii fluorescencyjnej i w jasnym polu.

- *Stosowane metody:*

- Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH) z udziałem wybranych sond molekularnych (fragment 45S rDNA, fragment 5S rDNA, syntetyczna oligomerowa sonda telomerowa typu *Arabidopsis*. Stosowano trawienie preparatów roztworem pepsyny przed hybrydyzacją. FISH w warunkach standardowej lub obniżonej siły płukań (stringency).
- Fluorescencyjne barwienie różnicowe CMA₃/DAPI/DA – wykrywające specyficznym GC-bogate chromatynowe segmenty.
- Fluorescencyjna wersja prążków C - „C-banding/DAPI”.
- Barwienie acetokarminem.
- Komputerowa analiza kariotypu (pomiar chromosomowe).
- Akwizycja obrazu mikroskopowego przy pomocy kamery CCD i oprogramowania.

- *Uzyskane wyniki:*

- Analizowane konfiguracje chromosomowe w mejozie (tetrawalenty i biwalenty) i ich częstości oraz brak translokacyjnych multiwalentów w skład których wchodziłyby więcej niż cztery chromosomy, świadczą że analizowane klony są regularnymi autotetraploidami ($2n = 4x = 24$).
- W materiale znaleziono rośliny z 1-7 chromosomami B (obserwowane w mitozie i mejozie), których źródłem jest charakterystyczna dla *Tradescantia* fragmentacja chromosomów. W przeciwieństwie do obserwacji wcześniejszych cytologów, w mejozie chromosomy B nie koniugowały z chromosomami A.
- W przeciwieństwie do sekcji *Rhoeo*, *T. virginiana* nie posiada wykrywalnej metodą C-banding heterochromatyny przycentromerowej, natomiast rejony przycentromerowe wykazują zupełny brak genów 45S rRNA oraz cytologicznie wyróżnialnych GC-bogatych segmentów
- 45S rDNA jest zlokalizowany wyłącznie terminalnie na bardzo wielu chromosomach. Większość loci 45S rDNA kolokalizuje z 5S rDNA. Dodatkowo, na wielu chromosomach wykryto interkalarne loci 5S rDNA.
- Wykryto telomerowe sekwencje typu *Arabidopsis* zlokalizowane terminalnie na wszystkich ramionach chromosomowych. Dodatkowo, wykryto zduplikowane telomerowe loci subterminalne, oraz na paru chromosomach - interkalarne zgrupowania sekwencji telomerowych oddalone znacznie od końców chromosomowych ramion.
- Wiele końcowych części chromosomów A posiada skomplikowaną strukturę cytomolekularną. Poza terminalnymi zgrupowaniami sekwencji telomerowych w ich skład wchodzi zduplikowane loci telomerowe zlokalizowane subterminalnie, heterochromatyna, 45S rDNA i 5S rDNA. Taką samą strukturę mają B chromosomy. Długość B chromosomów jest zbliżona do długości końcowych części chromosomów A.
- Kariotyp wykazuje strukturalną heterozygotyczność. Struktura cyto-molekularna chromosomów *T. virginiana* nie pozwala na wyróżnienie sześciu grup czterochromosomowych.

- *Wnioski:*

- Rozłożenie cytomolekularnych markerów sugeruje że w ewolucji kariotypu *T. virginiana* doszło do inwersji obejmujących od niewielkich po większe odcinki chromosomów.
- Inwersje są szczególnie prawdopodobne w obrębie małych dystalnych segmentów chromosomowych na wielu chromosomach. Zaproponowano, że zduplikowane zgrupowania sekwencji telomerycznej powstały na skutek niewielkich paracentrycznych inwersji.

- Ponieważ rozłożenie analizowanych markerów cyto-molekularnych w B-chromosomach oraz w obrębie małych dystalnych segmentów na chromosomach A jest bardzo zbliżone, B-chromosomy u *T. virginiana* najprawdopodobniej powstały z końcowych części chromosomów A, które uzyskały *de novo* aktywny centromer. Zaproponowany model ich dalszej ewolucji uwzględnia inwersję, akumulację sekwencji DNA specyficznych dla B-chromosomów oraz eliminację części 45S rDNA.

[7]

[7] Golczyk H, Massouh A, Greiner S. 2014. Translocations of chromosome end-segments and facultative heterochromatin promote meiotic ring formation in evening primroses. *Plant Cell* 26: 1280-1293.

- Główne cele pracy:

- Poznanie cyto-molekularnej struktury chromosomów/chromatyny u *Oenothera* w tym natury chromocentromów (patrz: Wstęp). Próba opracowania ogólnego modelu ewolucji PTH w oparciu o uzyskane dane strukturalne i znaną już charakterystykę systemu PTH u wiesiołka.

- Materiał roślinny:

- Oprócz tworzących pierścienie mejotyczny form PTH (4 gatunki: *Oe. glazioviana* linia r/r-lamarckiana Sweden, *Oe. biennis* linia suaveolens Standard, *Oe. biennis* linia suaveolens Grado, *Oe. villosa* ssp. *villosa* linia bauri Standard), przebadano strukturalne homozygoty. Wśród tych ostatnich były 3 gatunki uważane u *Oenothera* za formy pierwotne (*Oe. elata* ssp. *hookeri* linia hookeri de Vries, *Oe. elata* ssp. *hookeri* linia johansen Standard, *Oe. grandiflora* linia grandiflora Tuscaloosa), jedna linia powstała wtórnie z gatunku PTH (*Oe. glazioviana* lamarckiana) – *Oe. glazioviana* linia blandina de Vries, oraz mieszańiec międzygatunkowy *Oe. elata* ssp. *hookeri* linia johansen Standard x *Oe. grandiflora* linia grandiflora Tuscaloosa. Analizowane były chromosomy, jądra interfazowe i profazowe merystemu korzenia oraz jądra komórkowe innych wybranych tkanek/struktur (jądra premejotyczne, mejocyty, mikrospory, tapetum, epiderma korzenia, włósniki, miękisz liści, ksylemu i liścieni). Badania prowadzono na poziomie mikroskopii fluorescencyjnej.

- Stosowane metody:

- Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH) z udziałem wybranych sond molekularnych (45S rDNA, 5S rDNA, ludzkie i roślinne sekwencje telomeryczne).
- Metoda C-banding w dwóch wersjach: „Giemsa C-banding” oraz jej fluorescencyjna odmiana - „C-banding/DAPI”.
- Immunodetekcja wybranych epigenetycznych potranslacyjnych modyfikacji histonu H3.
- Przeszukiwanie genomowego DNA pod kątem obecności kanonicznych sekwencji telomerowych (*Arabidopsis*, *Homo sapiens*, *Bombyx*, *Chlamydomonas*, *Oxytricha*, *Tetrachymena*, *Ascaris*) przy pomocy asymetrycznego PCR.
- Barwienia fluorescencyjne – DAPI, chromomycyna A₃.
- Komputerowa analiza kariotypu (pomiar chromosomów, ustalanie statystycznej morfologii chromosomów).
- Akwizycja obrazu mikroskopowego przy pomocy kamery CCD i oprogramowania.

- **Uzyskane wyniki:** - W pracy wykazano, że system translokacyjny u *Oenothera*, a więc zarówno formy PTH, jak i strukturalne homozygoty, wykazuje się następującymi wspólnymi cechami:

- Podział każdego z 14 chromosomów na dwie epigenetyczne chromatynowe frakcje – duża środkowa część obejmująca centromer oraz niewielkie segmenty końcowe.
- Części środkowe chromosomów nie barwią się pozytywnie metodą prążków C oraz są ubogie w „euchromatynowy” histon H3 dimetylowany w lizynie 4 (H3K4me2) i histon H3 trimetylowany w lizynie 27 (H3K27me3). Nie wykazują też charakterystycznej dla heterochromatyny konstytutywnej pozytywnej immunolokalizacji histonu H3 dimetylowanego w lizynie 9 (H3K9me2) oraz histonu H3 dimetylowanego w lizynie 27 (H3K27me2). Części środkowe kondensują w komórkach dzielących się (merystem korzenia, merystem meiotyczny, dzielące się jednojądrowe tapetum) i są widoczne w postaci 14 dużych chromocentriów. Chromocentry są niezwykle duże i przypominają kształtem skondensowane chromosomy. Często można nawet wyróżnić dwa ramiona danego chromosomu i łączący je centromer. Takie obserwacje mogą rodzić podejrzenie, że obserwowane struktury są po prostu profazowymi chromosomami. Brak pozytywnej immunolokalizacji histonu H3 ufosforylowanego w serynie 10 (H3S10ph) i treoninie 11 (H3T11ph) na obszarze chromocentriów i jego pozytywna immunolokalizacja w obrębie chromosomów metafazowych i anafazowych na tym samym preparacie, był ostatecznym potwierdzeniem, że obserwowane struktury chromosomo-podobne są rzeczywiście chromocentrami w jądrach interfazowych. W/w modyfikacje histonu H3 są bowiem wysoce specyficzne dla kondensujących chromosomów podziałowych u *Eucaryota*. Chromocentry wykazują taki sam brak wybarwienia prążkami C oraz taki sam wzór immunodetekcyjny H3K4me2 i H3K27me3 jak odpowiadające im środkowe części chromosomów. Chromocentry ulegają jednak dekondensacji wraz z różnicowaniem się tkanek. W pewnych terminalnie zróżnicowanych tkankach (dojrzały miękisz liścia, dwujądrowe tapetum, miękisz ksylemu, włósniki) są nieobecne. Z kolei w innych (epiderma korzenia, dojrzewające mikrospory) są znacznie mniejsze niż w jądrach merystematycznych. Wszystkie w/w uzyskane wyniki wykazują jednoznacznie, że środkowe części chromosomów u *Oenothera* nie stanowią heterochromatyny konstytutywnej lecz tworzą heterochromatynę fakultatywną, o tkankowo-specyficznym wzorze kondensacji.
- Części dystalne chromosomów są w interfazie zdekondensowane. Immunobarwienia chromosomów mitotycznych ujawniły, że są one bogate w „euchromatynowy” histon H3 dimetylowany w lizynie 4 (H3K4me2) i histon H3 trimetylowany w lizynie 27 (H3K27me3). „Represyjny” marker H3K27me3 wspólnie z „permisywnymi” metylacjami H3K4 często dekorują euchromatynę, działając w procesach aktywacji/wyciszenia euchromatynowych genów. Tak więc części dystalne chromosomów odpowiadają bogatej w geny euchromatynie.
- Części środkowe i dystalne chromosomów różnią się wzorem kondensacji podczas mitozy/mejozy. Podczas profazy części środkowe są skondensowane już w bardzo wczesnej profazie (wcześnie kondensująca chromatyna), natomiast części dystalne kondensują bardzo późno (wczesna/środkowa metafaza) i tworzą tzw. późno kondensującą chromatynę.
- Immunobarwienia i testowanie podatności na degradację metodą C-banding wykazały, że wcześniej kondensująca chromatyna profazowa odpowiada heterochromatynie fakultatywnej obecnej w poprzedzającej interfazie. Inaczej mówiąc, chromatyna ta nie byłaby wcześniej kondensująca, gdyby wcześniej nie skondensowała fakultatywnie w interfazie dzielących się komórek. Z kolei wykazano, że późno kondensująca chromatyna odpowiada euchromatynie.
- Asymetryczny PCR i FISH nie wykazały obecności kanonicznych minisatelitarnych sekwencji telomerowych. Z kolei zastosowanie metody prążków C wykazało, że części dystalne chromosomów u *Oenothera* są zakończone drobnymi segmentami złożonymi z heterochromatyny konstytutywnej. Segmenty te okazały się bogate w H3K27me2 – modyfikację epigenetyczną biorącą udział w inaktywacji retroelementów i/lub satelitarnego DNA.
- Kariotypy wszystkich analizowanych wiesiołków charakteryzują się obecnością chromosomów metacentrycznych o bardzo zbliżonej długości oraz stałą liczbą dwóch loci 5S

rDNA. Loci 5S rDNA są zlokalizowane w obrębie satelitów chromosomów jąderkotwórczych, lekko na zewnątrz od loci 45S rDNA. Liczba loci 45S rDNA jest zmienna i wynosi od 4 do 6, w zależności od badanej linii.

- Metoda rDNA-FISH i analiza morfometryczna chromosomów pozwoliła po raz pierwszy u *Oenothera* na zidentyfikowanie chromosomowych typów oraz na skonstruowanie statystycznych kariogramów/idiogramów standardowych, opartych o uśrednione pomiary.
- Okazało się, że niektóre kompleksy różniące się formułami chromosomowymi, strukturalnie są bardzo podobne lub wręcz identyczne. Z kolei kompleks ^hjohansen i ^htuscaloosa, mimo, że posiadają tę samą formułę chromosomową, różnią się znacznie pod względem strukturalnym. Ponadto badania wykazały, że występowanie niektórych ramion chromosomowych ogranicza się tylko do danej linii/gatunku. Te obserwacje trudno pogodzić z teorią translokacji całych chromosomowych ramion.
- Porównanie struktury kariotypu *Oe. glazioviana* blandina z kariotypem *Oe. glazioviana* lamarckiana wykazało, że te dwie linie bardzo mocno różnią się od siebie pod względem rozłożenia loci rDNA oraz morfologii niektórych chromosomów.
- Jądra profazowe w mitozie i mejozie wykazują wyraźną polaryzację Rablowską (centromery na jednym biegunie, telomery na biegunie przeciwnym). Układ Rablowski był także obserwowany w części jąder interfazowych merystemu korzenia. Dodatkowo, dane wskazują że grupowanie telomerów po jednej stronie jądra zachodzi też w części jąder komórek zróżnicowanych.

- Wnioski:

- Badania wskazują że cechą cytogenetyczną kluczową dla zrozumienia całego systemu translokacyjnego u wiesiołka, a więc nie tylko PTH, jest strukturalne i przestrzenno-czasowe rozdzielanie genomu na dwie frakcje: rekombinującą i nierekombinującą. Frakcja nierekombinująca obejmuje środkowe części chromosomów i jest oddzielona od frakcji rekombinującej (części dystalne chromosomów) w tym znaczeniu, że różni się od niej pod względem lokalizacji przestrzennej (zajmowanie przeciwstawnych pozycji w obrębie układu Rablowskiego), struktury, stanu kondensacji podczas interfazy oraz dynamiką kondensacji (wcześnie kondensująca chromatyna vs. późno kondensująca chromatyna) podczas profazy. Niewątpliwie, powstanie tak pojętej genomowej kompartmentacji jest ważną preadaptacją w kierunku rozwoju PTH. Nierówna kondensacja chromatyny podczas profazy mejozy oraz skoncentrowanie sekwencji euchromatynowych w częściach dystalnych chromosomów na pewno promują skupianie wydarzeń rekombinacyjnych w częściach dystalnych chromosomów. Uzyskane wyniki wskazują ponadto, że fakultatywna kondensacja środkowych części chromosomów decyduje o tym, że będą one stanowić „wcześnie kondensującą chromatynę” podczas profazy. Analogicznie, zaburzenia procesu fakultatywnej heterochromatynizacji mogą potencjalnie wpływać na kondensację chromosomów mejozytycznych, a więc pośrednio na rekombinację mejozytyczną. Badania nad związkiem pomiędzy formowaniem się fakultatywnych chromocentrow a mejozytyczną kondensacją i rekombinacją u *Oenothera* powinny zatem stanowić w przyszłości obiecujący kierunek badań.
- Ogólny wzór kondensacji chromatyny interfazowej u *Oenothera* jest nietypowy, ponieważ chromocentry, które w komórkach merystematycznych są dobrze wyróżnione, ulegają dekondensacji w miarę różnicowania tkanek. U *Eucaryota* zwykle obserwuje się zwiększanie ilości skondensowanej chromatyny w toku ontogenezy/starzenia organów. W pracy zaproponowano że ten nietypowy wzór kondensacji ma dla *Oenothera* swoje szczególne uzasadnienie, bo sprzyja regularnemu formowaniu się pierścieni mejozytycznych, regularnej propagacji kompleksów Rennera oraz ich dywersyfikacji. Fakultatywna heterochromatynizacja środkowych chromosomowych segmentów w jądrach merystematycznych powinna bowiem zapobiegać zaburzeniom podziałów komórkowych (w mitozie i mejozie), które zazwyczaj zachodzą na skutek niedozwolonych wymian („ectopic exchanges”) oraz aktywacji elementów ruchomych w komórkach przechodzących cały cykl

komórkowy (tzn. fazę S i M). Konsekwencją nieznanymi pierwszorzędowymi rearanżacji chromosomowych, które spowodowały ograniczenie rekombinacji u *Oenothera* (patrz Wstęp) musiał być bowiem wzrost skomplikowania środkowych części chromosomów, m.in. na skutek przetasowania w ich obrębie segmentów pochodzących z różnych chromosomów. Wiadomo też, że nierekombinujące odcinki genomu mają tendencję do szczególnego gromadzenia repetytywno DNA i elementów ruchomych. Z kolei fakt, że środkowe części chromosomów są zdekondensowane w tkankach terminalnie zróżnicowanych i metabolicznie wysoce aktywnych sugeruje, że ich materiał genetyczny pełni jakąś rolę w funkcjonowaniu tych tkanek. Pozostaje to w zgodzie z założeniem, że u *Oenothera* środkowe części chromosomów są rejonami w których akumulują się nie tylko genetyczne lecz i fizjologiczne różnice pomiędzy kompleksami Rennera [20,21]. Podsumowując, zaproponowano, że nietypowy wzór kondensacji środkowych segmentów chromosomowych przyczynia się do obrony genomu przed szkodliwymi konsekwencjami zaburzeń podziałowych w komórkach dzielących się (kondensacja), natomiast w komórkach zróżnicowanych (dekondensacja) pozwala na udział w/w segmentów w funkcjonowaniu tych komórek oraz w fizjologicznej dywersyfikacji kompleksów Rennera. Fizjologiczne różnice między kompleksami Rennera mają istotne znaczenie dla strategii rozrodczej wiesiołków. Na przykład, tzw. „efekt Rennera” polega na współzawodnictwie gametofitów, tzn. gametofit który szybciej rośnie ostatecznie wytwarza dojrzały woreczek zalążkowy, tak więc przekazuje swój kompleks Rennera następnym pokoleniom [15,28].

- Uzyskane dane dotyczące struktury dystalnych części chromosomowych ramion (C-banding, immunodetekcja modyfikacji histonu H3, próba znalezienia sekwencji telomerowych) wskazują, że funkcję kanonicznych sekwencji telomerowych spełnia terminalna heterochromatyna konstytutywna, która jest zwykle złożona z wysokorepetytywnych sekwencji satelitarnego DNA i/lub inaktywowanych retroelementów. Dane te sugerują też wyraźnie, że crossing-over u *Oenothera* nie jest *stricte* terminalny, lecz subterminalny, tzn. zachodzi w obrębie permissywnej dla rekombinacji późno kondensującej euchromatyny, bogatej w H3K4me2 i H3K27me3. Gdyby crossing-over był terminalny, musiałby zachodzić w obrębie C-pozytywnej i bogatej w H3K27me2 terminalnej heterochromatyny konstytutywnej, co jest z cytologicznego punktu widzenia mało prawdopodobne (środowisko chromatynowe generalnie represywne dla crossing-over).
- Porównanie kariogramów/idiogramów uzyskanych dzięki kombinacji metody FISH ze statystyczną analizą morfometryczną chromosomów, analiza wzoru prążków C oraz immunobarwień doprowadziły do wniosku, że u *Oenothera* translokacje całych chromosomowych ramion są mało prawdopodobne. Najbardziej prawdopodobnym scenariuszem są translokacje satelitów chromosomów jąderkotwórczych oraz pozostałych euchromatynowych dystalnych odcinków bogatych w H3K4me2 i H3K27me3. Taki mechanizm translokacji pasuje do całości poczynionych w pracy obserwacji i do istotnych właściwości PTH u *Oenothera* (patrz: Wstęp). Pozbawione rekombinacji i fakultatywnie kondensujące odcinki środkowe chromosomów muszą być bowiem tymi częściami genomu, w których akumulują się (i są poddawane selekcji) różnice między kompleksami Rennera (patrz: Wstęp). Jeżeli odcinki te są w jakiś sposób ważne dla różnicowania/ontogenezy (na co wskazują niniejsze badania), pęknięcia w ich obrębie nie powinny być promowane przez ewolucję. Ponieważ pęknięcia w euchromatynowych odcinkach (ze względu na obecność w nich genów metabolizmu podstawowego) są także poddawane negatywnej selekcji, jedynym ewolucyjnie promowanym „kruchym” miejscem wydaje się być rejon graniczny - pomiędzy fakultatywną heterochromatyną a euchromatyną. Podsumowując, koncepcja translokacji całych chromosomowych ramion [15] została więc zakwestionowana.
- Porównanie struktury kariotypu *Oe. glazioviana* blandina z kariotypem *Oe. glazioviana* lamarckiana potwierdza intuicję wcześniejszych badaczy, zgodnie z którą powstawanie wtórnych homozygot u *Oenothera* wiąże się z szeregiem istotnych strukturalnych zmian chromosomowych.
- W oparciu o translokacje dystalnych euchromatynowych części ramion chromosomowych został opracowany model ewolucyjny tłumaczący powstawanie pierścieni mejotycznych,

ewolucję kompleksów Rennera i PTH, oraz wysoką kompatybilność kompleksów różniących się translokacjami. W skrócie model ten przedstawia się następująco:

- Każdy chromosomom w obrębie kompleksu składa się z 3 segmentów - dwóch segmentów dystalnych i segmentu środkowego (model trójelementowy). Translokujące euchromatynowe segmenty dystalne tworzą wszystkie możliwe kombinacje z segmentami środkowymi chromosomów. Model znacznie rozszerza liczbę możliwych kombinacji (kompleksów Rennera segmentalnie różniących się) w porównaniu z dwuelementowym modelem Clelanda (zakładającym translokacje całych ramion chromosomowych).
- Pewne określone kombinacje/sprzężenia w/w segmentów mogą po uzyskaniu selekcyjnej przewagi nad innymi kombinacjami ustabilizować się jako typy genomów/kompleksów Rennera. Translokacje odcinków dystalnych nie rozbijają środkowych części chromosomowych (w których akumulują się różnice między kompleksami Rennera), co umożliwia stałość tych typów.
- Kombinacje 3-elementowe umożliwiają powstawanie bivalentów, których chromosomy mają tą samą kombinację euchromatynowych segmentów dystalnych, lecz różnią się segmentami środkowymi. Takie „strukturalnie heterozygotyczne bivalenty” drastycznie obniżają żywotność gamet. Swobodna segregacja ich chromosomów doprowadza bowiem do powstawania gamet genetycznie niezbalansowanych. Duża część tych gamet będzie nieżywna ze względu na brak segmentu/segmentów środkowych. Obecność heterozygotycznych bivalentów powinna zatem wymusić selekcję w kierunku takich translokacji, które rozbijają takie bivalenty i sprawiają że ich chromosomy znajdują się obok siebie w pierścieniu mejotycznym i będą segregować do przeciwnych biegunów. Dopiero wtedy zapewniona jest 100% żywotność gamet. Im większa liczba heterozygotycznych bivalentów, tym mniejsza żywotność gamet i większa selekcja w kierunku powstawania dużych pierścieni mejotycznych ([7] - Fig. 5). Zaproponowano, że w wyjściowych pierścieni mejotycznych jest spowodowana obecnością heterozygotycznych bivalentów. Taki scenariusz wydarzeń jest w zgodny z ustaleniami genetyków populacyjnych, zgodnie z którymi selekcja przeciwko homozygotyczności, w naszym modelu przeciwko heterozygotycznym bivalentom, jest mechanizmem napędowym ewolucji w kierunku PTH (patrz: Wstęp).
- Translokacje dystalnych euchromatynowych segmentów, przy założeniu że każdy z nich posiada własne obligatoryjne „gorące miejsce” rekombinacyjne („recombination hot spot”), zapewniają pełną kompatybilność mejotyczną między kompleksami Rennera u dowolnego mieszańca *Oenothera*.

Podsumowanie

Opisane w cyklu siedmiu publikacji cyto-molekularne szczegóły chromosomowej organizacji u *Tradescantia* [1-6] i *Oenothera* [7], stanowią ważne odniesienie i podstawę dla dalszych badań nad strukturą i ewolucją nierekombinujących kompleksów Rennera. Na uwagę zasługuje kompleksowość badań, bogactwo użytych metod cytogenetycznych i ich pracochłonność. Stosowane metody (np. prążki C, immunolokalizacja modyfikacji histonów na chromosomach, FISH na chromosomach w pierścieniu mejotycznym, FISH i analiza kariotypu u *Oenothera*, itp.) są bardzo trudne, a ich opanowanie i standaryzacja oznaczały dla Wnioskodawcy wiele lat żmudnej pracy w laboratorium i małą możliwość podejmowania w tym czasie innego rodzaju aktywności naukowej. Dodatkową trudnością była odmienność materiału (*Oenothera* vs. *Tradescantia*): to, co dało się uzyskać u *Tradescantia* okazało się nie do końca możliwe w przypadku *Oenothera*, i *vice versa*. O skali trudności świadczy prosty fakt, że mimo że system PTH jest modelowym obiektem do badań nad kompleksowymi chromosomowymi rearanżacjami, opisywanym już od początków XX w., przedstawione w Rozprawie wyniki mają w większości pionierski charakter. Nie bez znaczenia wydaje się też fakt, że współpracę w badaniach nad wiesiołkiem zaproponowano mi między innymi dlatego, że satysfakcjonujące opanowanie metody FISH oraz C-banding okazało się bardzo trudne dla próbujących tego dokonać wcześniejszych badaczy. Na uwagę zasługuje fakt, że mimo trudności

metodycznych i przeciwieństw, badany materiał był wyczerpujący. Obejmował on w sumie 13 genetycznie różnych form (trzy odmiany *T. spathacea*, gatunek *T. virginiana*, 7 gatunków *Oenothera*, 1 wtórnie homozygotyczną linię *Oenothera*, jeden mieszaniec międzygatunkowy *Oenothera*). Poza tym, analizowane były nie tylko chromosomy mitotyczne i mejotyczne, lecz także całe spektrum różnych tkanek. Omawiane prace zostały opublikowane w renomowanych zagranicznych czasopiśmie. O istotności uzyskanych danych przekonuje także fakt, że zaproponowany nowy model ewolucji PTH został przez światowej sławy specjalistów oceniony bardzo wysoko i dopuszczony do publikacji w wysoko notowanym czasopiśmie *Plant Cell* [7]. Model ten został wyróżniony i zarekomendowany w opiniotwórczym *F1000Prime*, jako generujący nowe i obiecujące perspektywy w badaniach nad ewolucją genomu i remodelingiem chromatyny w toku różnicowania u roślin (szczegóły w Załączniku 3).

Wśród opisanych osiągnięć, szczególne znaczenie mają następujące, nowe dla nauki dokonania:

- Opracowanie niezawodnego systemu identyfikacji chromosomów i chromosomowych ramion u *T. spathacea* w oparciu o rozłożenie loci 45S i 5S rDNA oraz AT-bogatej segmentów. Od tej pory można całkowicie pewnie identyfikować poszczególne chromosomy i ramiona w mitozie. Nie trzeba już do tego celu używać trudnych do analizy stadiów mejotycznych [1,3,4].
- Wykrycie obecności GC-bogatej frakcji chromatyny przycentromerowej, w tym nieaktywnych transkrypcyjnie genów rRNA na wszystkich 12 chromosomach *T. spathacea* [1-5]
- Zaproponowanie nowego oryginalnego modelu ewolucji kariotypu PTH u *T. spathacea* [3,4].
- Ustalenie, że odmiana *T. spathacea* concolor posiada dwa kompleksy, które są niemal identyczne z kompleksem β form PTH. Zaproponowanie mechanizmu powstawania odmiany concolor [5].
- Opisanie cytomolekularnej struktury (morfologia, ułożenie heterochromatyny, loci 45S i 5S rDNA, zgrupowań sekwencji TTTAGGn) A i B-chromosomów u *Tradescantia* i zaproponowanie oryginalnego mechanizmu ewolucji B-chromosomów [6]
- Opisanie cytomolekularnej struktury (loci 45S i 5S rDNA, modyfikacje potranslacyjne histonu H3, prążki C, wyszukiwanie minisatelitarnych powtórek telomerycznych) chromatyny/chromosomów u *Oenothera* [7].
- Wykrycie heterochromatyny fakultatywnej u *Oenothera* i udowodnienie, że tworzy się ona z dużych środkowych części wszystkich czternastu chromosomów. Zaproponowanie wiesiołka jako organizmu modelowego i wyjątkowego do badań nad remodelingiem chromatyny w ontogenezie [7].
- Opracowanie oryginalnego modelu ewolucji PTH u *Oenothera* w oparciu o translokacje odcinków dystalnych chromosomów [7].

Tytułem podsumowania, można stwierdzić, że na drodze do permanentnej translokacyjnej heterozygotyczności mogą być wybierane odmienne strategie ewolucyjne. Uzyskane wyniki wskazują bowiem, że dwa omawiane taksony (*Oenothera* i *Tradescantia*) różnią się typem wzajemnych translokacji, a także charakterem wcześniejszych etapów ewolucji kariotypu. Ponieważ nie ma konieczności dla której koniugujące ramiona chromosomowe w pierścieniu miałyby być takiej samej długości, wydaje się zmiennym i nieprzypadkowym fakt, że zarówno u *Oenothera*, jak i w sekcji *Rhoeo* koniugujące ramiona chromosomów w pierścieniu są u *Oenothera* i *Rhoeo* dobrze dopasowane na długość. Dla sekcji *Rhoeo* ta okoliczność, oraz inne istotne dane (ilość i rozłożenie GC- i AT-bogatej chromatynowej frakcji, chromosomowa organizacja rybosomalnego DNA, statystycznie oszacowane różnice w długości koniugujących ramion i ich uśrednione sumy), pozwoliły na zaproponowanie translokacji ramion chromosomowych [1-4]. U *Oenothera*, uzyskane wyniki (analiza kariotypów przy użyciu techniki rDNA-FISH, immunolokalizacja modyfikacji histonu H3, monitorowanie wzoru kondensacji chromatyny w cyklu komórkowym i w trakcie różnicowania) jak

również specyfika rozwiniętego w tym taksonie systemu PTH, wskazują na translokacje dystalnych i równych co do długości euchromatynowych części ramion [7].

Struktura chromosomów/chromatyny analizowanych taksonów jest z jednej strony podłożem umożliwiającym zachodzenie wzajemnych translokacji, z drugiej zaś strony jest efektem zmian pierwotnych, które ją ukształtowały. Klasyczne obserwacje u *Tradescantia* sugerują, że takimi powszechnymi i pierwotnymi dla taksonu rearanżacjami są inwersje, co potwierdzają badania nad kariotypem *T. virginiana* - gatunku typowego dla *Tradescantia*, aczkolwiek nie reprezentującego systemu PTH [6]. Szczególnie znaczenie dla takiego wniosku ma odkryta po raz pierwszy organizacja dystalnych części chromosomowych oraz zaproponowany model ewolucji B-chromosomów. Dzięki szczególnej skłonności do inwersji, u *Tradescantia* mogło się wykształcić podatne podłoże dla ewolucji w kierunku PTH [29]. Inwersje w formie heterozygotycznej stanowią najprostszy sposób na ułatwienie i przyspieszenie ewolucji PTH poprzez zahamowanie crossing-over, wytworzenie pierwotnych sprzężeń i zapoczątkowanie molekularnej dywergencji nierekombinujących ze sobą części genomu [20,21,29]. Z kolei translokacje zabezpieczają przed rozpadem uprzednio powstałych sprzężeń i poprzez wprowadzenie supersprzężeń i udoskonalenie zbalansowanego systemu genów letalnych, doprowadzają stan heterozygotyczności do formy krańcowej.

Obecnie dzięki genomice wiadomo, że inwersje to główny mechanizm reorganizacji genomów. Co więcej, badania wykazują, że tam gdzie dochodzi do ograniczenia rekombinacji (np. ewolucja chromosomów płci), pierwszorzędną rolę pełnią właśnie inwersje [74]. O ile molekularnie „oddalające się od siebie”, nierekombinujące frakcje genomu u *T. virginiana* to wciąż tylko stosunkowo niewielkie części genomu (B-chromosomy oraz końcowe części chromosomów A), to u form PTH są to już całe zespoły chromosomów (kompleksy Rennera). Niestety, analiza ułożenia sekwencji repetytywnych na chromosomach, nawet przy znacznym zwiększeniu liczby różnych mapowanych sekwencji, nie jest w stanie w satysfakcjonujący sposób oszacować postulowanego udziału inwersji w ewolucji kariotypu. Jedynym w pełni skutecznym sposobem na osiągnięcie tego celu, a więc pogłębienie w przyszłości niniejszych badań, jest rozszyfrowanie liniowego ułożenia unikalnych sekwencji DNA na chromosomach. Techniki do tego celu się nadające to FISH z udziałem klonów BAC (ang. „Bacterial Artificial Chromosome”) w charakterze sond, sekwencjonowanie oraz bioinformatyczna analiza.

Jak wykazują niniejsze badania, uwarunkowaniem sprzyjającym wzajemnym translokacjom i rozwojowi PTH u *Oenothera* jest ograniczenie euchromatyny do niewielkich dystalnych segmentów chromosomowych oraz wczesna kondensacja/fakultatywna heterochromatyzacja dużych środkowych części chromosomów [7]. Nie wiadomo jak powstało to niezwykle strukturalno-czasowe zróżnicowanie genomu, wiele jednak wskazuje że jest nabytkiem ewolucyjnym wcześniejszym niż wzajemne translokacje. Po pierwsze, opisane w Rozprawie badania wykazały, że jest ono właściwe nie tylko dla form PTH lecz także dla ancestralnych strukturalnych homozygot oraz mieszańców. Żadna z tych cech nie występuje w sekcji *Rhoeo* ani też nie została odnotowana u innych gatunków *Tradescantia*. To oznacza, że dwa omawiane taksony różnią się nie tylko rodzajem i zakresem wzajemnych translokacji, lecz także wcześniejszymi etapami ewolucji, zmierzającej jednak finalnie do tego samego celu, którym jest PTH.

Kolejna różnica dotyczy organizacji zakończeń chromosomowych (patrz: Wstęp). W przeciwieństwie do systemu PTH u *T. spathacea* [1], u *Oenothera* nie wykryto kanonicznych, zależnych od telomerazy minisatelitów [7]. Zamiast nich występuje terminalna C-pozytywna heterochromatyna. Wiele wskazuje więc na to, że u *Oenothera* wyskokorepetytywne sekwencje heterochromatynowe odgrywają rolę telomerów [7]. Organizacja telomerów i rejonów im towarzyszących jest ważna dla rozwoju i funkcjonowania PTH (patrz: Wstęp). Stąd też istotne jest ustalenie jak funkcjonują telomery u *Oenothera* (np. w jaki sposób dochodzi do ich odbudowy) i jak to się stało, że nie są zbudowane z kanonicznych minisatelitarnych sekwencji.

Badania z kolei wykazały, że elementem cytomolekularnego podłoża wspólnym dla *Oenothera* i sekcji *Rhoeo*, jest spolaryzowana Rablowska budowa jąder komórkowych w szlaku płciowym i somatycznym [1,3,4,7]. Niewątpliwie uporządkowany układ chromosomów w jądrach interfazowych/profazowych sprzyja zachodzeniu regularnych translokacji i chroni kompleksy Rennera przed nieprawidłową koniugacją i błędami segregacyjnymi, tak więc sprzyja ewolucji w kierunku PTH.

Intrygującym zjawiskiem jest powstawanie całkowitych strukturalnych homozygot (tworzących same biwalenty w mejozie) z form PTH. Jest to bardzo specyficzne i szybkie przełączanie się z nie-Mendelowskiej „funkcjonalnej apomiksji” (permanentny pierścień z dwiema grupami sprzężeń) na standardową drogę Mendelowskiego rozmnażania (biwalenty i niezależna segregacja chromosomów). Nie wiadomo jaką rolę odegrały „wtórne homozygoty” w ewolucji taksonów, w których doszło do powstania PTH. Istotne zatem jest poznanie cytogenetycznych mechanizmów warunkujących ten zjawisko. Ten proces, na co wskazują uzyskane dane, ma miejsce u *T. spathacea* i skutkuje powstaniem odmiany *concolor* z dwoma alelalnymi kompleksami $^h\beta$ [5]. Ujawniona cyto-molekularna struktura kompleksu $^h\beta$ [5] odzwierciedla jego wtórne pochodzenie od formy PTH. Wydaje się, że powstawanie wtórnych homozygot powinno wymagać zaistnienia szczególnych mechanizmów. Rzeczywiście, u *Oenothera* sporadyczne powstawanie całkowitych homozygot strukturalnych z form PTH jest wynikiem szeregu głębokich strukturalnych zmian chromosomowych, co potwierdza porównanie struktury kariotypu *Oe. glazioviana* blandina z kariotypem *Oe. glazioviana* lamarckiana [7]. Jednak uzyskane dane nie wskazują, by podczas powstawania alelalnego kompleksu $^h\beta$ (z kompleksu β) u *T. spathacea*, doszło do jakichkolwiek istotnych strukturalnych rearanżacji chromosomowych [5]. Wydaje się więc, że systemy PTH *Oenothera* i *Tradescantia* zasadniczo różnią się pod tym względem.

Istotną cechą opisanych prac jest ujawnienie bardzo atrakcyjnych dla cytogenetyki właściwości *Oenothera* i *Tradescantia*. Tak na przykład wykazano, że u wiesiołka współistnieje zakrojona na szeroką skalę fakultatywna heterochromatyzacja (duże chromocentry fakultatywne w jądrach merystematycznych) z nieprzypadkową organizacją chromatyny jądrowej (układ Rablowski), co jest wyjątkowe w świecie roślin [7]. Wskazuje to, że wiesiołek stanowi unikalny układ modelowy do badań nad zjawiskiem remodelingu chromatyny (kondensacji/dekondensacja) w toku ontogenezy, jak również nad funkcjonalnym znaczeniem architektury jądrowej u roślin. Opisane prace wykazały też, że do zgłębiania znaczenia architektury jądrowej wyjątkowo dobrze nadaje się PTH u *Tradescantia* [1,2,3,4]. Daje ona z jednej strony okazję poznania mechanizmów rozprzestrzenienia się przycentromerowych GC- i AT-bogatej bogatej sekwencji DNA – ich molekularnej homogenizacji, koncertowej ewolucji, z drugiej zaś strony – dywergencji pozostałych, nie asocjujących ze sobą części genomu. Rozprzestrzenianie się sekwencji repetytywnych, ich dywergencja i koncertowa ewolucja, to zjawiska będące w centrum zainteresowania cytogenetyki [75], stąd też poruszana tematyka i uzyskane wyniki wydają się mieć duże znaczenie. Obiecujący kierunek badań w przyszłości stanowi także ewolucja chromosomów B w obrębie strukturalnie heterozygotycznego kariotypu *T. virginiana*, obejmująca interesującą problematykę związaną z biologicznym znaczeniem B chromosomów dla organizmu oraz powstawaniem w ich obrębie funkcjonalnego centromeru/kinetochoru [6].

8. Omówienie przebiegu pracy uczelnianej i dalszych planów naukowych*

* W niniejszym rozdziale przedstawiam ogólny zarys mojej pracy uczelnianej. Szczegółowy wykaz wszystkich osiągnięć naukowo-poznawczych, publikacji, grantów/projektów, działalności organizacyjnej i dydaktycznej, współpracy naukowej, nagród/wyróżnień i innych, został przedstawiony w Załączniku 3.

Po obronie pracy magisterskiej pt. „Wyprowadzenie hodowli kalusa trzech gatunków *Allium* oraz charakterystyka cytologiczna jednej z nich” wykonanej w Zakładzie Cytologii i Embriologii Roślin (Instytut Botaniki) UJ pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Joachimiaka i zakończeniu z oceną bardzo dobrą studiów magisterskich na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego, rozpocząłem w Zakładzie Cytologii i Embriologii Roślin (Instytut Botaniki) UJ na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego dzienne studia doktoranckie. Po dwóch latach zostałem zatrudniony kolejno na stanowisku asystenta i adiunkta w Zakładzie Cytologii i Embriologii Roślin Instytutu Botaniki UJ. Moimi naukowymi opiekunami po uzyskaniu przeze mnie stopnia magistra byli kolejno prof. dr hab. Lesław Przywara oraz prof. dr hab. Andrzej Joachimiak z Zakładu Cytologii i Embriologii Roślin UJ. Moje zainteresowania badawcze w okresie po uzyskaniu

stopnia magistra do uzyskania stopnia doktora koncentrowały się wokół zagadnień związanych ze strukturą kariotypu, chromosomów oraz jąder interfazowych. Szczególnie interesowałem się strukturalnymi i liczbowymi mutacjami chromosomowymi *in vivo* oraz *in vitro*. W tym okresie próbowałem znaleźć odpowiedni układ hodowlany *in vitro* oraz organizm roślinny, które byłyby w przyszłości wygodnymi obiektami do bardziej zaawansowanych badań nad zmianami chromosomowymi oraz strukturą chromosomów. W tym celu kontynuowałem badania nad kalusem *Allium sibiricum* i skierowałem swoje zainteresowania także w stronę hodowli zawieszinowych (*Daucus carota*), które zwykle są genetycznie niestabilne oraz w stronę *Tradescantia spathacea* (Syn. *Rhoeo spathacea*) - gatunku dla cytogenetyki ważnego, ze względu na kompleksowe rearanżacje strukturalne (translokacje). Wyniki mojej pracy w tym okresie zaowocowały czterema publikacjami oraz czterema doniesieniami konferencyjnymi. Ten okres w karierze zawodowej pozwolił mi zaznajomić się ze stosowanymi w Zakładzie klasycznymi technikami cytologicznymi tj. z całościowym (nieróżnicowym) barwieniem somatycznych chromosomów/chromatyny oraz z różnicową metodą prążków C (C-banding). Dodatkowo, samodzielnie opracowałem metodykę wyprowadzania i utrzymywania roślinnej hodowli zawieszinowej, ponieważ w Zakładzie do tej pory nie prowadzono badań na hodowlach zawieszinowych i takich hodowli nie wyprowadzano. W czerwcu 2000r. obroniłem pracę doktorską pod tytułem "Struktura kariotypu oraz jąder interfazowych u *Rhoeo spathacea* (Swartz) Stearn (*Commelinaceae*)", w której do analizy kariotypu *Rhoeo* (= *Tradescantia spathacea*) zastosowałem C-banding, barwienie klasyczne oraz analizę obrazu mikroskopowego.

W okresie po uzyskaniu stopnia doktora, w trakcie pracy w charakterze adiunkta na Uniwersytecie Jagiellońskim (Instytut Botaniki), oraz później (i obecnie) na Katolickim Uniwersytecie Lubelskim (Instytut Biotechnologii), stopniowo doprecyzowałem własną tematykę jako analizę naturalnej autosomalnej heterozygotyczności strukturalnej w celu zgłębiania mechanizmów rearanżacji chromosomowych oraz promujących je cytogenetycznych uwarunkowań. Do tego celu doskonale nadają się organizmy tworzące w mejozie pierścienie zamiast bivalentów, oraz rośliny z B chromosomami, które można znaleźć w rodzajach *Tradescantia* i *Oenothera*. Celem moim było także opracowanie nowych metod i na ile to możliwe, uwzględnienie w badaniach także aspektu mejotycznego, ponieważ mejoza umożliwia bezpośrednią detekcję heterozygotyczności (łańcuchy i pierścienie chromosomowe zamiast bivalentów) oraz warunkuje jej dziedziczenie. Pierwszym moim owocem testowania wielu nowych metodycznych przepisów było opracowanie wydajnej (zmodyfikowanej przeze mnie) procedury srebrzenia (do tej pory nie stosowanej w Instytucie), która u *T. spathacea* pozwoliła na specyficzną lokalizację jąderkotwórczych na chromosomach oraz funkcjonalne odróżnienie ich od tzw. przewężeń dodatkowych [50]. Innym wyzwaniem było opanowanie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Dzięki uprzejmości Pani prof. dr hab. Jolanty Małuszyńskiej (Katedra Anatomii i Cytologii Roślin Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach), mogłem zapoznać się w praktyce z podstawami techniki FISH. Z pomocą dr Roberta Hasteroka (obecnie prof. dr hab. Robert Hasterok) z Katedry Anatomii i Cytologii Roślin zlokalizowałem geny 45 rRNA i 5S rRNA na chromosomach *T. spathacea*, dzięki czemu po raz pierwszy możliwa stała się pełna identyfikacja chromosomów u tego gatunku, co zaowocowało wspólną publikacją w czasopiśmie *Genome* [1] oraz umieszczeniem przez Redakcję *Genome* fotografii z tego artykułu na okładce czasopisma. Znajomość techniki FISH pozwoliła mi później na znaczną jej modyfikację pod kątem własnych potrzeb (m.in. zmiany w pozyskiwaniu sond, ich znakowania i detekcji, modyfikacje trawień, płukań, itp.). Kolejne opanowane przeze mnie nowe metody to udoskonalona technika analizy cytologicznej stadiów mejotycznych/komórek mejotycznych [31]; fluorescencyjne barwienia różnicowe: C-banding/DAPI, DAPI/AMD, DAPI/DA/CMA₃ i ich sekwencyjne stosowanie w kombinacji z techniką FISH [2-6]; oryginalna metoda uzyskiwania ostrych fluorescencyjnych obrazów mikroskopowych (będąca odpowiednikiem mikroskopii konfokalnej), polegająca na kombinacji barwienia DAPI i manualnej dekonwolucji obrazu [31,76,77]; immunodetekcja potranslacyjnych modyfikacji histonów [7]. Opanowanie tej ostatniej umiejętności było możliwe dzięki życzliwości prof. Andreeasa Houbena, który umożliwił mi zapoznanie się z zasadą technik immunocytochemicznych na chromosomach podczas jednego z moich pobytów w IPK w Gatersleben (Niemcy). Opracowane przeze mnie techniki analizy komórek mejotycznych, jak również sposoby radzenia sobie z nietypowymi problemami związanymi z mejozą oraz zmodyfikowaną przeze mnie wersję fluorescencyjnych barwień różnicowych, przekazałem z kolei zainteresowanym studentom i cytologom z Krakowa, którzy odtąd korzystają z nich w swoich własnych badaniach. Także

opracowana przeze mnie metoda manualnej dekonwolucji [31,76,77] okazała się bardzo przydatna dla Zakładu Cytologii i Embriologii Roślin UJ i kolegów z innych zakładów. Uzyskiwanie zdjęć ostrych w całej płaszczyźnie obrazu stanowiło bowiem do tej pory spory problem, a wynaleziona przez mnie metoda całkowicie go eliminuje. Istotne jest, że metoda ta, nie pociągając za sobą żadnych dodatkowych kosztów, umożliwia znaczną poprawę ogólnej jakości zdjęć. Równocześnie z własnej inicjatywy uczestniczyłem w kursach/warsztatach poszerzających możliwości badawcze.

Konsekwentne udoskonalenie warsztatu badawczego zaowocowało szeregiem publikacji pogłębiających wiedzę o strukturze chromosomów/chromatyny w mejozie/mitozie u *Tradescantia* i *Oenothera*. Część tych badań prowadziłem w ramach współpracy zagranicznej (patrz niżej). W rezultacie, obecnie odnotowuję zwiększającą się liczbę cytacji w prestiżowych czasopismach oraz w renomowanych opracowaniach książkowych, np. cytowania w *Science* (dwa razy), *Nature Reviews Genetics*, *Plant Journal*, *Evolution*, *P.N.A.S.*, *PLoSOne*, *Plant Genome Diversity. Vol2. Physical Structure, Behavior and Evolution of Plant Genomes (Springer)*, itd (kompletna informacja w Załączniku nr 6). Jestem także zapraszany przez renomowane czasopisma do recenzowania artykułów naukowych. Rozbudowanie warsztatu badawczego sprawiło także, że projekt badawczy MNiSW nr N301 116 32/4008 [tytuł: „Badania cytogenetyczne i molekularne nad strukturą kompleksów Rennera w rodzaju *Rhoeo (Commelinaceae)*”], który uzyskałem i którego byłem kierownikiem w latach 2007-2010, został przez Ministerstwo oceniony na ocenę bardzo dobrą. W swoją tematykę badawczą angażowałem też innych pracowników naukowych oraz studentów. Byłem promotorem prac magisterskich, które dotyczyły poruszanej przeze mnie tematyki badawczej.

Jako wykonawca angażowałem się również w wewnątrzuczelnianą i międzyuczelnianą współpracę i w polskie projekty badawcze MNiSW (kompletna informacja w Załączniku nr 3). Generalnie mówiąc, poruszana w nich tematyka dotyczyła struktury kariotypów roślinnych oraz zmienności somaklonalnej i procesu regeneracji roślin w warunkach kultury *in vitro*. Współpraca ta zaowocowała publikacjami w takich czasopismach jak: *Genome*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, *Acta Biologica Cracoviensia Ser. Botanica, Genetics and Molecular Biology*. Na szczególną uwagę zasługuje tutaj mój udział w badaniach nad mechanizmami chromosomowych mutacji i powstawaniem mikrojąder w kalusie *Allium fistulosum* (publikacja w *Genome*).

Warta podkreślenia jest ta prowadzona przeze mnie współpraca zagraniczna, która zaowocowała już publikacjami w renomowanych czasopismach. Są to wspólne badania z prof. Herrmannem, prof. Wannerem i dr Meurerem z Uniwersytetu Ludwika Maksymiliana w Monachium; z prof. Bockiem i dr Greinerem z Instytutu Maxa Plancka w Poczdamie-Golm; z prof. Börnerem z Instytutu Biologii/Genetyki Uniwersytetu Humboldta w Berlinie, oraz z dr A Cuadrado z Uniwersytetu Alcalá de Henares, w Madrycie. Współpracujący ze mną badacze niemieccy koncentrują się na molekularnej strukturze genomu jądrowego, plastydowego i mitochondrialnego u *Oenothera* i u innych roślin. Podczas naukowego pobytu w Uniwersytecie Ludwika Maksymiliana i w czasie kolejnych pobytów naukowych w Instytucie Maxa Plancka, miałem możliwość, w ramach wspólnych badań nad wiesiołkiem, nie tylko zebrać odpowiedni materiał (identyfikacja linii, odpowiednich stadiów, oszacowanie żywotności tkanek, itp.), opracować dla niego szczegółowo metodykę cytologiczną i dokonać jego gruntownej cytologicznej analizy, lecz także poznać wybrane metody molekularnej analizy genomowego DNA. Pierwsza wspólna praca (w której jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem) opublikowana w czasopiśmie *Genome* [31], dotyczyła przebiegu mejozy u *Oenothera* i polegała na zredefiniowaniu stadiów mejotycznych, co do których nie było w literaturze spójnych danych. Dwa kolejne wspólne artykuły [22,23], opublikowane w kolejno *Genetics* i *Heredity*, były już połączeniem danych cytogenetycznych oraz molekularnych. Istotnym wynikiem tych prac jest opracowanie mapy sprzężonych markerów AFLP oraz wykazanie, że u *Oenothera* zarówno u permanentnych heterozygot translokacyjnych jak i u homozygotycznych (tworzących regularne bivalenty) ancestralnych gatunków, rekombinacja mejotyczna jest praktycznie niewykrywalna. Kolejny wspólny artykuł naukowy [7], którego jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem, opublikowany w prestiżowym czasopiśmie *Plant Cell* (wchodzący w skład osiągnięcia naukowego), dotyczył cyto-molekularnej struktury chromatyny/chromosomów wiesiołka i nowego modelu ewolucji PTH. Artykuł ten został wyróżniony i zarekomendowany w opiniotwórczym *F1000Prime*, jako generujący nowe i obiecujące perspektywy w badaniach nad ewolucją genomu i remodelingiem chromatyny w toku różnicowania u roślin. Z kolei współpraca z

ośrodkiem hiszpańskim zaowocowała opracowaniem nowej techniki ND-FISH (ang. „non-denaturing FISH”) i wspólną publikacją w renomowanym czasopiśmie *Chromosome Research* [78]. Rezultatem zagranicznej współpracy były także wspólne doniesienia konferencyjne/referaty, które zostały dostrzeżone i docenione na forum międzynarodowym i krajowym.

Doceniając moje umiejętności i doświadczenie w technikach cytogenetycznych i cytologicznych, prof. Herrmann (Uniwersytetu Ludwika Maksymiliana w Monachium) oraz prof. Bock (Instytut Maxa Plancka w Poczdamie-Golm) zaproponowali mi udział w prowadzonych przez siebie tematach badawczych, które nie były wtedy bezpośrednio związane z prowadzoną przez mnie tematyką. Pierwszy temat dotyczy organizacji genomu plastydowego i jego zachowania się w ontogenezie. Problemem, z którym się samodzielnie zmierzyłem była wizualizacja plastydowego DNA (pt-DNA) w różnych stadiach rozwoju liści u wybranych gatunków roślin. Jest to zadanie bardzo trudne, szczególnie na bardzo wczesnym i bardzo późnym etapie rozwoju plastydów. Istniejące do tej pory metody generowały obrazy o niezadowalającej jakości. Technikę wizualizacji pt-DNA opanowałem na tyle dobrze, że możliwe było dokonanie rewizji koncepcji dotyczących losu plastydowego DNA w ontogenezie i przedstawienie wyników w dwóch wspólnych publikacjach [76,77]. Jedna z nich ukazała się w *Molecular Genetics and Genomics* (jestem w niej drugim autorem), druga w *Plant Cell* (jestem w niej pierwszym autorem). Ogólnie mówiąc, nasze badania kwestionują promowany przez niektóre ośrodki pogląd, zgodnie z którym podczas różnicowania i starzenia się organów dochodzi do znacznego ubytku plastydowego DNA. W tej chwili jesteśmy na etapie finalizowania kolejnej wspólnej publikacji dotyczącego omawianej tematyki.

Drugi temat dotyczy poziomego transferu informacji genetycznej w rejonie zrastania się tkanek szczepionych roślin, a mój udział polega na analizie cytologicznej i cytogenetycznej badanego materiału. Do niedawna uważano, że w miejscu zrastania się dwóch szczepionych roślin nie dochodzi między nimi do wymiany informacji genetycznej. Nasze dotychczasowe badania wykazały, że u tytoniu, w miejscu zrastania się tkanek dwóch genetycznie różnych (w naturze nie krzyżujących się ze sobą) szczepionych gatunków, dochodzi do spontanicznego poziomego transferu nie pojedynczych genów, ale całego jądrowego DNA. Powstały w ten sposób nowy typ komórek somatycznych ma pełną informację genetyczną obu gatunków, tzn. sumę ich chromosomów. Co więcej, okazało się, że z takich komórek można było wyprowadzić allopoliploidalnego mieszańca międzygatunkowego, który jest w rzeczywistości nowym gatunkiem, powstałym z pominięciem drogi płciowej. Wyniki te okazały się więc na tyle istotne i unikalne (poziomy transfer genomów generujący powstawanie gatunku allopoliploidalnego na drodze aseksualnej), że wspólna publikacja mogła ukazać się w prestiżowym czasopiśmie naukowym *Nature* [79]. Praca ta wskazuje na metodę szczepienia jako potencjalne narzędzie do uzyskiwania nowych gatunków/odmian oraz daje możliwość innego spojrzenia na rolę poziomego transferu informacji genetycznej w ewolucji roślin. Następnym planowanym etapem tych badań jest cytologiczna i cytogenetyczna analiza procesu przepływu informacji genetycznej pomiędzy szczepionymi roślinami. Inną ważną dla mnie okolicznością dotyczącą współpracy z ośrodkami niemieckimi, była okazja do zapoznania się z takimi metodami jak real time q-PCR i zaawansowanymi technikami mikroskopii elektronowej tkanek roślinnych.

Zarówno w Instytucie Botaniki UJ, jak i obecnie w Instytucie Biotechnologii KUL, zajmowałem się/zajmuję także działalnością dydaktyczną i organizacyjną. Na szczególną uwagę zasługuje opracowanie przez mnie i wdrożenie nowych ćwiczeń i wykładów na KUL dla kierunku Biotechnologia (w sumie cztery nowe opracowane przeze mnie kursy). Kursy te prowadzę jako ich kierownik (szczegóły w Załączniku 3). W Instytucie Biotechnologii KUL jestem kierownikiem tematu statutowego pt. „Badania cyto-molekularne nad strukturą genomu eukariotycznego”, który został przez Ministerstwo zaakceptowany do finansowania na podstawie przedstawionej przeze mnie charakterystyki badań i mojego dorobku naukowego. W ramach tematu pogłębiam swoje zainteresowania dotyczące cyto-molekularnego podłoża strukturalnej heterozygotyczności u *Tradescantia* i *Oenothera*. Między innymi, prowadzę badania mające na celu szczegółowe zmapowanie wielu modyfikacji epigenetycznych na chromosomach oraz zagęszczenie mapy markerów cyto-molekularnych z użyciem uzyskanych niedawno sond typu BAC oraz innych sond opracowanych na bazie plazmidów, reprezentujących gatunkowo-specyficzne sekwencje DNA. Kontynuuję także opisaną wyżej współpracę zagraniczną.

Dzięki nowoczesnym urządzeniom służącym do badań molekularnych, obecnie udoskonalam zaawansowane metody molekularnej cytogenetyki, głównie BAC-FISH na chromosomach i BAC-fiber-FISH na rozciągniętych włóknach chromatynowych, a także techniki *stricte* molekularne. Opisane w Rozprawie cyto-molekularne badania nad strukturą chromosomów/chromatyny u *Oenothera* wpisują się dobrze w cały szereg podjętych starań których celem jest ustanowienie wiesiołka jako organizmu modelowego do badań nad różnymi aspektami ewolucji genomu jądrowego, epigenetyką i rolą plastydów w specjacji (w: [22]). W ramach tak pojętej strategii badawczej, planowane jest przeze mnie i moich współpracowników zintegrowanie istniejącej mapy genetycznej [23] z danymi cytogenetycznymi, czyli przypisanie przy pomocy metody FISH (z zastosowaniem różnorodnych sond molekularnych, w tym sond typu BAC) danej grupy sprzężeń konkretnemu chromosomowi. Dzięki temu będzie możliwe w przyszłości zintegrowanie klasycznych formuł chromosomowych Clelanda [15] z uzyskanymi danymi cytogenetycznymi i genetycznymi (genetyka klasyczna i molekularna). Badania te będą też w przyszłości podstawą dla szerszej, cytogenetyczno-molekularnej analizy procesów ewolucyjnych u *Oenothera*.

Ja już wspominałem wyżej, opanowanie przez mnie szeregu trudnych technik wymagało wielu lat żmudnej pracy w laboratorium, z niewielką możliwością podejmowania w tym czasie innego rodzaju aktywności naukowej. Obecnie poznanie wszystkich niezbędnych technik oraz krytyczna znajomość literatury, dają mi więcej czasu na podejmowanie aktywności publicystycznej innej niż eksperymentalne prace naukowe. Moje plany zmierzają więc także do tego, aby wykorzystać tę sposobność i opublikować serię popularyzujących dojrzałą wiedzę tekstów biologicznych, które mogą okazać się przydatne dla studentów i środowiska akademickiego.

9. Cytowana literatura

- [1] Golczyk H., Hasterok R., Joachimiak A.J. 2005. FISH-aimed karyotyping and characterization of Renner complexes in permanent heterozygote *Rhoeo spathacea*. *Genome* 48: 145-153.
- [2] Golczyk H., Joachimiak A., Hasterok R. 2008. Pericentromeric GC-rich chromatin in *Rhoeo*. Evidence from soma and germ-line. *Caryologia* 61: 388-391.
- [3] Golczyk H., Hasterok R., Szklarczyk M. 2010. Ribosomal DNA, tri- and bipartite pericentromeres in the permanent translocation heterozygote *Rhoeo spathacea*. *Cellular & Molecular Biology Letters* 15: 651-664.
- [4] Golczyk H. 2011. Cytogenetics of the permanent translocation heterozygote *Rhoeo spathacea* var. *variegata*. Implications for complex chromosome rearrangements in *Rhoeo*. *Caryologia* 64: 325-334.
- [5] Golczyk H. 2011. Breakdown of the balanced lethals in *Rhoeo*. The structure of the alethal Renner complex of the homozygotic stock of *Rhoeo*. *Cytogenetic and Genome Research* 134: 229-233.
- [6] Golczyk H. 2011. Structural heterozygosity, duplication of telomeric (TTTAGGG)_n clusters and B chromosome architecture in *Tradescantia virginiana* L. *Cytogenetic and Genome Research* 134: 234-242.
- [7] Golczyk H., Massouh A., Greiner S. 2014. Translocations of chromosome end-segments and facultative heterochromatin promote meiotic ring formation in evening primroses. *Plant Cell* 26: 1280-1293.
- [8] Stebbins G.L. 1950. *Variation and evolution in plants*. Columbia University Press, New York.
- [9] Stebbins G.L. 1971. *Chromosomal evolution in higher plants*. Addison-Wesley, Reading, Mass.
- [10] Levin D.A. 2002. *The role of chromosomal change in plant evolution*. Oxford Series in Ecology and Evolution. New York. Oxford University Press.
- [11] Satterfield S.K., Mertens T.R. 1972. *Rhoeo spathacea*: A tool for teaching meiosis and mitosis. *Journal of Heredity* 63: 375-378.
- [12] Kenton A., Davies A., Jones K. 1987. Identification of Renner complexes and duplications in permanent hybrids of *Gibasis pulchella* (*Commelinaceae*). *Chromosoma* 95: 424-434.

- [13] James S.H. 1965. Complex hybridity in *Isotoma petraea*. I. The occurrence of interchange heterozygosity, autogamy and balanced lethal system. *Heredity* 20: 341-353.
- [14] Goldblatt P. 1980. Uneven diploid chromosome numbers and complex heterozygosity in *Homeria* (Iridaceae). *Systematic Botany* 5: 337-340.
- [15] Cleland R.E. 1972. *Oenothera. Cytogenetics and evolution*. Academic Press, London and New York.
- [16] Dietrich, W., Wagner, W.L., and Raven, P.H. 1997. Systematics of *Oenothera* section *Oenothera* subsection *Oenothera* (*Onagraceae*). *Systematic Botany Monographs* 50. The American Society of Plant Taxonomists.
- [17] Tilquin J.P. 1981. An unusual case of a complex heterozygote presenting no taxonomical problem in *Chelidonium majus* L. (*Papaveraceae*). *Experientia* 37: 341-342.
- [18] Holsinger K.E. and Ellstrand N.C. 1984. The evolution and ecology of permanent translocation heterozygotes. *American Naturalist* 124: 48-71
- [19] Kurabayashi M, Lewis H, Raven PH (1962). A comparative study of mitosis in the *Onagraceae*. *American Journal of Botany* 49: 1003-1026.
- [20] Darlington CD. 1929. Ring-formation in *Oenothera* and other genera. *Journal of Genetics* 20: 345-363.
- [21] Darlington C.D. 1931. The cytological theory of inheritance in *Oenothera*. *Journal of Genetics* 24: 405-474.
- [22] Rauwolf U, Golczyk H, Meurer J, Herrmann RG, Greiner S. 2008. Molecular marker systems for *Oenothera* genetics. *Genetics* 180: 1289-1306.
- [23] Rauwolf U., Greiner S., Mracek J., Rauwolf M., Golczyk H., Mohler V., Herrmann RG., Meurer J. 2011. Uncoupling of sexual reproduction from homologous recombination in homozygous *Oenothera* species. *Heredity* 107: 97-94.
- [24] Darlington C.D. 1936. The limitation of crossing-over in *Oenothera*. *Journal of Genetics* 32: 343-352.
- [25] Johnson, M. T. J., FitzJohn R.G., Smith S. D., Rausher M. D., Otto S. P. 2011. Loss of sexual recombination and segregation is associated with increased diversification in evening primroses. *Evolution* 65: 3230-3240.
- [26] Johnson M.T.J. 2011. The contribution of evening primrose (*Oenothera biennis*) to a modern synthesis of evolution ecology. *Population Ecology* 53: 9-21.
- [27] de Waal Malefijt, M., Charlesworth, B. (1979). A model for the evolution of translocation heterozygosity. *Heredity* 43: 315-331
- [28] Harte, C. (1994). *Oenothera*. Contributions of a plant to biology. In: *Monographs on Theoretical and Applied Genetics*. R. Frankel, M. Grossman, H.F. Linskens, P. Maliga, R. Riley, eds (Berlin, Heidelberg, New York, Springer)
- [29] Swanson CP: The distribution of inversions in *Tradescantia*. *Genetics* 25:438-465 (1940).
- [30] Wimber D.E. 1968. The nuclear cytology of bivalent and ring-forming rheos and their hybrids. *American Journal of Botany* 55: 572-574.
- [31] Golczyk H., Musial K., Rauwolf U., Meurer J., Herrmann R.G., Greiner S. 2008. Meiotic events in *Oenothera* - a non-standard pattern of chromosome behaviour. *Genome* 51: 952-958
- [32] Brown S.P., Levin D.A. 2011. Social dilemmas among supergenes: intragenomic sexual conflict and a selfing solution in *Oenothera*. *Evolution* 65: 3360-3367.
- [33] Johnson M.T.J., Smith S.D. and Rausher M. D. 2009. Plant sex and the evolution of plant defenses against herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106: 18079-18084.
- [34] Johnson M.T.J., Smith S.D. and Rausher M. D. 2010. Effects of plant sex on range distributions and allocation to reproduction. *New Phytologist* 186: 769-779.
- [35] Johnson MT, Ives AR, Ahern J, Salminen JP. 2014. Macroevolution of plant defenses against herbivores in the evening primroses. 2014. *New Phytologist* 203:267-79.

- [36] Hersch-Green EI, Myburg H, Johnson MT. 2012. Adaptive molecular evolution of a defence gene in sexual but not functionally asexual evening primroses. *Journal of Evolutionary Biology* 25:1576-86
- [37] Agrawal AA, Johnson MTJ, Hastings AP, Maron JL. 2013. A Field experiment demonstrating plant life-history evolution and its eco-evolutionary feedback to seed predator populations. *The American Naturalist* 181 (S1): S35-S45
- [38] Greiner S., Köhl K. 2014. Growing evening primroses (*Oenothera*). *Frontiers in Plant Science* 5: 38.
- [39] Agren J.A., Greiner S., Johnson M.T.J., Wright S.I. 2014. No evidence that sex and transposable elements drive genome size variation in evening primroses. *BioRxiv* (free online archive and distribution service for unpublished preprints in the life sciences). Cold Spring Harbor Laboratory. DOI: 10.1101/007161.
<http://biorxiv.org/content/early/2014/07/16/007161>
- [40] Guerra M. 1988. Characterization of different types of condensed chromatin in *Costus* (*Zingiberaceae*). *Plant Systematics and Evolution* 158:107-115
- [41] Hunt D.R. 1986. *Campelia, Rhoeo, Zebrina* united with *Tradescantia*. *Kew Bulletin* 41: 401-405.
- [42] Faden R.B. 1998. *Commelinaceae*. In: *The Families and Genera of Vascular Plants* 4, Ed. Kubitzki K. Berlin, Springer, pp. 109-127.
- [43] Burns J.H., Faden R.B., Steppan S.J. 2011. Phylogenetic studies in the *Commelinaceae* subfamily *Commelinoideae* inferred from nuclear ribosomal and chloroplast DNA Sequences. *Systematic Botany* 36: 268-276.
- [44] Tschermak-Woess E. 1947. Cytologische und embryologische untersuchungen an *Rhoeo discolor*. *Österreichische Botanische Zeitschrift* 94: 128-135.
- [45] Golczyk H. 2013. Cytogenetics of *Tradescantia spathacea* (syn. *Rhoeo spathacea*): A review. *Annales Universitatis Marie Curie-Skłodowska. Sectio C* 68: 39-53.
- [46] Sax K. 1931. Chromosome ring formation in *Rhoeo discolor*. *Cytologia* 3: 36-53.
- [47] Flagg R. O. 1958. A mutation and an inversion in *Rhoeo discolor*. *Journal of Heredity* 49: 185-188.
- [48] Golczyk 2000. Struktura kariotypu oraz jąder interfazowych u *Rhoeo spathacea* (Swartz) Stearn (*Commelinaceae*). *Praca doktorska*. Uniwersytet Jagielloński. Instytut Botaniki.
- [49] Golczyk, H., Joachimiak, A. 1999. Karyotype structure and interphase chromatin organization in *Rhoeo spathacea* (Sw.) Stearn (*Commelinaceae*). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 41: 143-150.
- [50] Golczyk H., Joachimiak A. 2003. NORs in *Rhoeo* revisited. *Caryologia* 56: 31-35.
- [51] Natarajan, A.T., and Natarajan, S. 1972. The heterochromatin of *Rhoeo discolor*. *Hereditas* 72: 323-330.
- [52] Joachimiak A., Kornaś A., Krawczyk J. 1994. Alterations in chromosome morphology after sequential aceto-orceine staining and C-banding. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 36: 23-30.
- [53] Darlington 1937. *Recent Advances in Cytology*. Second edition. Philadelphia. P. Blakiston's son and Co.
- [54] Sansome, F. W., and Philp, J. 1939. *Recent Advances in Plant Genetics*. Second Edition, J. & A. Churchill Ltd., London.
- [55] Swanson C.P. 1957. *Cytology and Cytogenetics*. Prentice-Hall, Inc.
- [56] Steiner E. 1974. *Oenothera*. In: King R.C., ed. *Handbook of Genetics* Vol. 2. Plenum Press, New York., pp. 223-245.
- [57] Grant V. 1975. *Genetics of flowering plants*. Columbia University Press. New York and London.
- [58] Darlington C.D. 1958. *The Evolution of Genetic Systems*. 2d ed. Basic Books, New York.
- [59] SRB A.M., Owen R.D., Edgar R.S. 1969. *Genetyka Ogólna.*, red. Gajewski W, Makarewicz A. Państwowe Wydawnictwo Naukowe

- [60] Malinowski E. 1978. *Genetyka*. Warszawa. Państwowe Wydawnictwo Naukowe.
- [61] Gajewski W. 1987. *Genetyka Ogólna i Molekularna*. Warszawa. Państwowe Wydawnictwo Naukowe.
- [62] Rogalska S., Małuszyńska J., Olszewska M.J. 1999. *Podstawy Cytogenetyki Roślin*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe.
- [63] Weiss-Schneeweiss H., Schneeweiss GM. 2013. Karyotype diversity and evolutionary trends in angiosperms. IJ Leitch et al. (eds) *Plant Genome Diversity Vol 2*, pp 209-230, *Physical Structure, Behaviour and Evolution of Plant Genomes*. Springer-Verlag, Wien.
- [64] Darlington CD: Chromosome behaviour and structural hybridity in the *Tradescantiae*. *Journal of Genetics* 21:207-286 (1929).
- [65] Darlington CD: Chromosome behaviour and structural hybridity in the *Tradescantiae*. II. *Journal of Genetics* 35:259-280 (1937).
- [66] Koller P. 1932. Further studies in *Tradescantia virginiana* var. *humilis* and *Rhoeo discolor*. *Journal of Genetics* 26: 81-96.
- [67] Whitaker TW: Fragmentation in *Tradescantia*. *American Journal of Botany* 23:517-519 (1936).
- [68] Sax K 1937: Chromosome behaviour and nuclear development in *Tradescantia*. *Genetics* 25:523-533.
- [69] Giles N: Spontaneous chromosome aberrations in *Tradescantia*. *Genetics* 25:69-87 (1940).
- [70] Bhaduri P.N. 1942. Application of new technique to cytogenetical reinvestigation of the genus *Tradescantia*. *Journal of Genetics* 44: 87-127.
- [71] Riley UP: Chromosome aberrations in natural populations of *Tradescantia paludosa*. *Nucleus* 1:11-44 (1958).
- [72] Malithano DA: Meiotic behaviour of two supernumerary and structurally changed chromosomes in *Tradescantia paludosa*. *Hereditas* 81:1-18 (1975).
- [73] Hauber DP: Supernumerary chromosomes in *Tradescantia* I. Meiotic behavior of three homologous isochromosomes. *Genetica* 75:117-121 (1987).
- [74] Kirkpatrick M. 2010. How and why chromosome inversions evolve. *PLoS Biol* 8(9): e1000501.
- [75] Mariotti B., Manzano S., Kejnovsky E., Vyskot B., Jamilena M. 2009. Accumulation of Y-specific satellite DNAs during the evolution of *Rumex acetosa* sex chromosome. *Molecular Genetics and Genomics* 281: 249-259.
- [76] Rauwolf U., Golczyk H., Greiner S., Herrmann R.G. 2010. Variable amounts of DNA related to the size of chloroplasts III. Biochemical determinations of DNA amounts per organelle. *Molecular Genetics and Genomics* 283: 35-47.
- [77] Golczyk H., Greiner S., Wanner G., Weihe A., Bock R, Börner T., Herrmann R.G. 2014. Chloroplast DNA in mature and senescing leaves - a reappraisal. *Plant Cell* 26: 847-854.
- [78] Cuadrado A., Golczyk H., Jouve N. 2009. A novel, simple and rapid nondenaturing FISH (ND-FISH) technique for the detection of plant telomeres. Potential used and possible target structures detected. *Chromosome Research* 17: 755-762.
- [79] Fuentes I., Stegemann S., Golczyk H., Karcher D., Bock R. 2014. Horizontal genome transfer as an asexual path to the formation of new species. *Nature* 511: 232-235.

Lublin, 12. 08. 2014.



Hieronim Golczyk - podpis