



You have downloaded a document from
RE-BUŚ
repository of the University of Silesia in Katowice

Title: Szczegółowe mapowanie genu związanego z pierwszym etapem rozwoju włośników u jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.)

Author: Patrycja Gajewska

Citation style: Gajewska, Patrycja. (2018). Szczegółowe mapowanie genu związanego z pierwszym etapem rozwoju włośników u jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.). Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



Uniwersytet Śląski
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Genetyki

Patrycja Gajewska

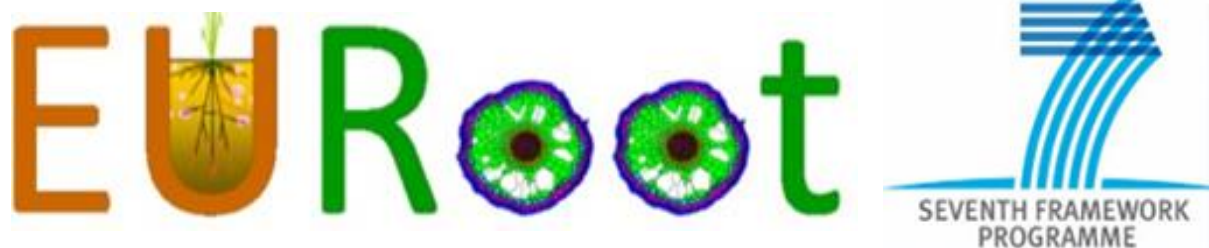
240566

Szczegółowe mapowanie genu związanego z pierwszym etapem
rozwoju włóśników u jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.)

Promotor: prof. dr hab. Iwona Szarejko

Promotor pomocniczny: dr Agnieszka Janiak

Katowice, 2018



Praca wykonana w ramach projektu EURoot - Enhancing resource Uptake from Roots under stress in cereal crops („Zwiększenie efektywności pobierania substancji odżywczych przez korzenie roślin zbożowych w warunkach stresu”) finansowanego przez Unię Europejską w ramach 7. Programu Ramowego. Numer grantu: 289300. Część badań prowadzono w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Numer grantu: 2486/7.PR/2012/2.

Składam serdeczne podziękowania

***prof. dr hab. Iwonie Szarejko**
za opiekę naukową, oraz cenne uwagi udzielone
w trakcie pisania pracy,*

***dr Agnieszce Janiak**
za cenne wskazówki, przekazaną wiedzę
oraz życzliwość,*

*mojej **Rodzinie**, a w szczególności **Piotrowi**
za wyrozumiałość i nieocenione wsparcie.*

Spis treści

1. Wstęp i cele pracy	1
2. Przegląd literatury	3
2.1. Rola włośników korzeniowych	3
2.2. Mechanizmy ustalania wzoru epidermy korzenia	5
2.3. Mechanizmy formowania primordium i wzrostu szczytowego włośników u jednoliściennych	12
2.4. Klonowanie genów w oparciu o mapę	17
2.4.1. Populacje mapujące	20
2.4.2. Konstrukcja mapy genetycznej	22
2.4.3. Tworzenie mapy genetycznej o wysokiej rozdzielczości	24
2.4.4. Fizyczna mapa i identyfikacja genów kandydackich	25
2.5. Metody wysokowydajnego sekwencjonowania jako nowa strategia do izolacji genów	32
3. Materiał i metody	34
3.1. Materiał	34
3.2. Warunki wzrostu i fenotypowanie	35
3.3. Analiza rozszczeń fenotypowych w pokoleniu F ₂	37
3.4. Strategia poszukiwania nowych markerów do mapowania	38
3.5. Izolacja genomowego DNA	40
3.6. Amplifikacja loci SSR i wizualizacja produktów amplifikacji	41
3.7. Projektowanie starterów dla nowych markerów molekularnych i genów kandydackich	42
3.8. Optymalizacja warunków reakcji PCR i wizualizacja produktów reakcji	43
3.9. Analiza wyników sekwencjonowania	43
3.10. Zastosowane metody genotypowania	44
3.10.1. InDel	44
3.10.2. CAPS	45
3.10.3. High Resolution Melting	45
3.10.4. EcoTILLING	47
3.11. Analiza sprzężeń markerów i konstruowanie mapy genetycznej	49
3.12. Analiza sekwencji z wytypowanego interwału	49
3.13. Funkcjonalna i strukturalna analiza genów kandydackich	50
3.14. Strukturalna analiza genu HORVU7Hr1G030250 oraz identyfikacja konserwatywnych motywów białkowych	50
3.15. Przewidywanie potencjalnych skutków mutacji w genie HORVU7Hr1G030250	51

3.16. Izolacja RNA	51
3.17. Analizy ekspresji genów	52
3.18. Konstrukcja drzewa filogenetycznego.....	54
4. Wyniki	56
4.1. Powiększenie populacji mapującej F ₂ <i>rh11.b</i> x ‘Morex’	56
4.2. Analizy segregacji dla markerów SSR oraz wybór rekombinantów	56
4.3. Wyprowadzanie nowych markerów typu SNP położonych w rejonie genu <i>rh11</i>	59
4.4. Wyprowadzanie nowych markerów typu SNP w oparciu o mapę fizyczną genomu jęczmienia oraz konstrukcja mapy genetycznej na podstawie powiększonej populacji.....	64
4.5. Charakterystyka przedziału fizycznego obejmującego locus <i>rh11</i> i funkcjonalna analiza genów kandydackich	72
4.6. Sekwencjonowanie genów kandydackich i identyfikacja mutacji w genie HORVU7Hr1G030250	77
4.7. Charakterystyka strukturalna i funkcjonalna kandydata HORVU7Hr1G030250	79
4.7.1. Analiza <i>in silico</i> miejsca mutacji i określenie jej potencjalnego wpływu na proces splicingu oraz strukturę syntetyzowanego białka.	81
4.8. Weryfikacja ko-segregacji genu kandydackiego <i>Hvrh11</i> z fenotypem strefy włosnikowej korzeni.....	86
4.9. Analiza sekwencji genu HORVU7Hr1G030250 u bezwłosnikowego mutantu <i>brb</i>	90
4.10. Analiza ekspresji potencjalnego genu kandydackiego HORVU7Hr1G030250 w trzech strefach korzenia.....	91
4.11. Analiza ekspresji wybranych genów potencjalnie zaangażowanych w inicjację procesu morfogenezy włosników u jęczmienia.....	92
5. Dyskusja	95
5.1. Konstrukcja mapy genetycznej odcinka chromosomu 7HS, zawierającego gen <i>rh11</i> ...	95
5.2. Mutacja w genie kodującym czynnik transkrypcyjny bHLH powoduje bezwłosnikowy fenotyp	98
6. Wnioski	107
7. Literatura.....	109
8. Streszczenie.....	137
9. Summary	139
10. Aneks.....	141
11. Wykaz skrótów.....	167

1. Wstęp i cele pracy

Ustalenie powiązania pomiędzy sekwencją genu a jego biologiczną funkcją ma istotne znaczenie w zrozumieniu podstawowych procesów rozwoju roślin i ich odpowiedzi na sygnały środowiskowe. W ustaleniu tego powiązania, a więc w badaniach funkcji genów, powszechnie wykorzystywanym narzędziem są mutanty, charakteryzujące się łatwo rozpoznawalną zmianą fenotypu. W ciągu dziesięcioleci, na drodze mutagenyzy fizycznej, chemicznej i insercyjnej wyprowadzono kolekcje mutantów różnych gatunków roślin, zarówno modelowych, jak i uprawnych. Kolekcje te, liczące często dziesiątki tysięcy homozygotycznych linii mutantów, stanowią cenne zasoby genetyczne i główne narzędzie do badania genetycznych podstaw procesów biologicznych. Jęczmień (*Hordeum vulgare* L.) jest jednym z gatunków, dla których zgromadzono i scharakteryzowano kolekcje mutantów ze zmianami różnych cech morfologicznych, fizjologicznych czy biochemicznych. Obecnie, wiele genów jęczmienia zostało dobrze scharakteryzowanych na poziomie molekularnym i znane są genetyczne podstawy obserwowanych zmian fenotypowych u mutantów, a wiele z tych genów zostało zidentyfikowanych na podstawie informacji o ich położeniu na mapie genetycznej.

Kolekcja mutantów włosnikowych jęczmienia, wyprowadzona w Katedrze Genetyki UŚ stanowi ważne źródło materiałów do realizacji badań związanych z identyfikacją genów odpowiedzialnych za morfogenezę włosników u tego gatunku. Kolekcja ta obejmuje mutanty o włosnikach zatrzymanych w różnych stadiach rozwoju, z których pierwszym jest etap różnicowania ryzodermy na komórki wytwarzające włosniki (trichblasty) i komórki niewykształcające włosników (atrachoblasty). Mutanty z zaburzeniami tego stadium mają zmieniony wzór ryzodermy, nie wykształcają zróżnicowanych komórek i są całkowicie pozbawione włosników (*root hairless, rh1*). W ciągu ostatnich lat siostrzane linie alleliczne mutantów *rh1.a* i *rh1.b* zostały wykorzystane do opisu mechanizmów związanych ze specjalizacją komórek ryzodermy jęczmienia i analizy roli włosników w molekularnej odpowiedzi na stres suszy. Zlokalizowano także gen odpowiedzialny za bezwłosnikowy fenotyp mutantów *rh1* w chromosomie 7HS jęczmienia, jednak gen leżący u podstaw tego fenotypu do tej pory nie został zidentyfikowany.

W prezentowanej pracy podjęto próbę identyfikacji genu *rh1* odpowiedzialnego za pierwszy etap morfogenezy włosników u jęczmienia, tj. różnicowanie komórek ryzodermy. Dla osiągnięcia tego celu wykorzystano strategię klonowania genu w oparciu o mapę

genetyczną uzyskaną przez krzyżowanie bezwłosnikowego mutantu z odmianą jęczmienia o innym tle genetycznym. Prowadzone badania obejmowały następujące etapy:

1. Wyprowadzenie dużej populacji mapującej pokolenia F₂ mutant *rh11.b* x odmiana 'Morex' (4952 roślin F₂) i stworzenie wysokorozdzielczej mapy genetycznej rejonu chromosomu 7HS, zawierającego poszukiwany gen.
2. Wytypowanie markerów flankujących gen *rh11* i zakotwiczenie mapy genetycznej na mapie fizycznej genomu jęczmienia, identyfikacja interwału zawierającego geny kandydackie.
3. Porównanie sekwencji genów kandydackich u mutantów bezwłosnikowych i ich odmian wyjściowych w celu wytypowania najbardziej prawdopodobnego kandydata.
4. Analiza wpływu mutacji zidentyfikowanej w jednym z genów kandydackich na strukturę kodowanego białka.
5. Analiza ekspresji zidentyfikowanego genu oraz innych genów związanych z rozwojem włosników w różnych strefach korzenia mutantów bezwłosnikowych i ich odmian wyjściowych.

2. Przegląd literatury

2.1. Rola włosników korzeniowych

System korzeniowy ma kluczowe znaczenie dla rozwoju rośliny, a w spełnianiu jego funkcji istotną rolę odgrywają włosniki korzeniowe, które są długimi cylindrycznymi wypustkami wyspecjalizowanych komórek epidermy. Włosniki charakteryzują się wzrostem szczytowym, objawiającym się zorganizowanym polarnym rozmieszczeniem składników komórkowych i organelli. Biorą one udział w absorpcji wody i składników mineralnych, takich jak azot, fosfor, potas, siarka oraz żelazo co jest związane z obecnością transporterów składników odżywczych w komórkach (Takahashi i inni, 2000; Vert i inni, 2002; Carminati i inni, 2017; Grun i inni, 2018). Od wczesnych etapów rozwoju rośliny włosniki umożliwiają zakotwiczenie w podłożu (Peterson i inni, 1996; Ryan 2001; Haling i inni, 2013), stanowią również miejsce endosymbiotycznych interakcji z mikroorganizmami glebowymi (Hofer, 1991; Oldroyd, 2001; Oldroyd i Dixon, 2014). Badania prowadzone dla *H. vulgare* i *Triticum aestivum* wykazały, że włosniki istotnie zwiększają powierzchnię korzenia. W przypadku jęczmienia obliczono, że włosniki mogą spowodować zwiększenie powierzchni korzenia od 112% do 245% dla różnych odmian, a dla pszenicy od 95% do 341% (Gahoonia i inni, 1997). Tak znaczny wzrost powierzchni korzenia może mieć istotny wpływ na zdolność do wchłaniania wody oraz substancji odżywczych (Richardson i inni, 2011; Haling i inni, 2014). W optymalnych warunkach dostępu do wody i składników odżywczych obecność włosników wydaje się nie mieć wpływu na plon roślin (Chmielewska i inni, 2014), jednak brak włosników może być niekorzystny dla funkcjonowania roślin w warunkach stresu. Wiadomo, że ograniczona dostępność fosforu negatywnie wpływa na wzrost roślin (Haling i inni, 2014; Zhang i inni, 2018), co znacząco ogranicza ich plonowanie (Lynch, 2007). Z tych powodów, rola włosników we wchłanianiu fosforu była badana u różnych gatunków, np. u *H. vulgare*, *T. aestivum*, *Zea mays* i *Brachypodium distachyon* (Green i inni, 1991; Gahoonia i inni, 1997; Brown i inni, 2012; Zhang i inni, 2018). Przykładowo, badania poboru fosforu u jęczmieniu wykazały, że rośliny uprawiane w warunkach niskiej dostępności tego pierwiastka wytwarzają włosniki bardziej gęste i dłuższe, w porównaniu z roślinami uprawianymi w warunkach optymalnej zawartości fosforu (Gahoonia i inni, 1997; Brown i inni, 2012; Haling i inni, 2014).

Co ciekawe, niewiele jest badań eksperymentalnych opisujących rolę włosników w pobieraniu wody. Niektóre dowody na znaczenie włosników w tym procesie pochodzą

z badań prowadzonych nad bezwłośnikowym mutantem *brb* (*bald root barley*) i jego odmianą rodzicielską 'Pallas'. Analizy wykazały, że korzenie roślin typu dzikiego charakteryzują się o 55% wyższą wydajnością poboru wody, w porównaniu do pozbawionego włosników mutantu (Segal i inni, 2008). Dodatkowo, Brown i współpracownicy (2012) udowodnili, że w warunkach połączenia skrajnego niedoboru fosforu ze stresem niedoboru wody, brak włosników u jęczmienia ma negatywny wpływ na rozwój cech ważnych agronomicznie, takich jak np. masa i liczba ziaren z rośliny oraz biomasa nadziemnej części rośliny. Kwaśniewski i inni (2016) zaproponowali hipotezę o prawdopodobnej roli włosników jako sensorów środowiskowych u *H. vulgare*. Przeprowadzono analizę transkryptomu bezwłośnikowego mutantu *rhl1.a* i jego odmiany wyjściowej 'Karat' poddanych stresowi suszy. Badanie wykazało, że w korzeniach odmiany rodzicielskiej dochodzi do specyficznej aktywacji genów związanych z sygnalizacją stresu niedoboru wody i ochroną przed stresem w warunkach suszy, natomiast tej aktywacji nie wykryto w korzeniach bezwłośnikowego mutantu. Możliwe jest, że występowanie włosników ułatwia aktywację mechanizmów tolerancji na suszę na drodze wykrywania niekorzystnych warunków środowiskowych (Kwaśniewski i inni, 2016). Powyższe badania wskazują, że włosniki korzeniowe mogą mieć znaczenie dla polepszenia plonów i tolerancji na stres, szczególnie w przypadku gleby uprawnej o niskiej jakości (Meister i inni, 2014). Zmienność genetyczna cech włosników korzeniowych może być wykorzystana w programach hodowlanych, m.in. w celu zwiększenia skuteczności pobierania różnych składników odżywczych. Jednak aby wykorzystać ten potencjał w programach hodowlanych, konieczne jest zrozumienie mechanizmów genetycznych i molekularnych, leżących u podstaw rozwoju włosników.

Włosniki korzeniowe stały się również przedmiotem wielu badań fizjologicznych i genetycznych. Organizmy wielokomórkowe posiadają szereg różnorodnych typów komórek, które są odmienne pod względem wielkości, kształtu, kompozycji składników i pełnionej przez nie funkcji. Z tego powodu podstawowym elementem rozwoju tych organizmów jest odpowiednie różnicowanie się typów komórek. Łatwość obserwacji oraz uniwersalność wielu mechanizmów kierujących rozwojem włosników sprawia, iż stały się one znakomitym modelem do poznania i zrozumienia procesów dotyczących różnicowania pojedynczych komórek u roślin.

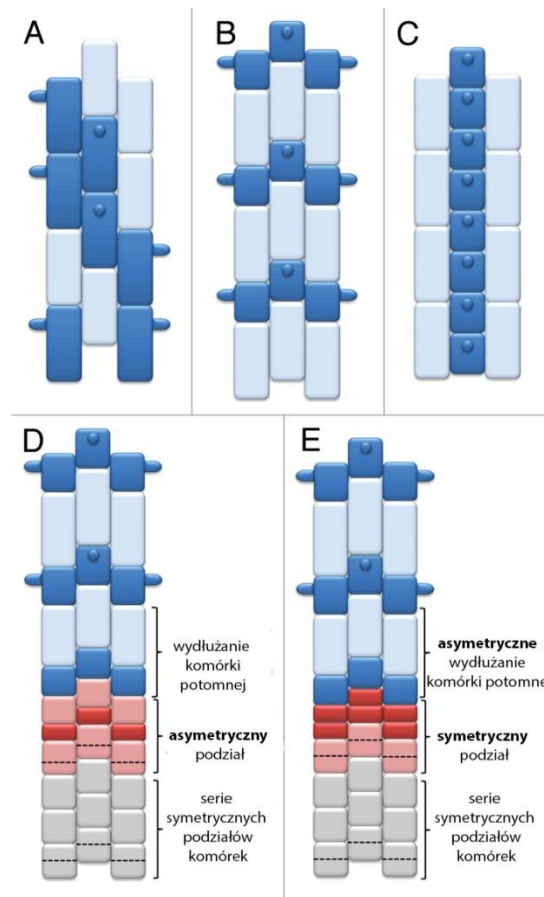
2.2. Mechanizmy ustalania wzoru epidermy korzenia

Morfogeneza włosników jest procesem złożonym, w którym wyróżniono cztery podstawowe etapy: (i) ustalenie wzoru epidermy, (ii) inicjację rozwoju włosników (iii) przejście do wzrostu szczytowego oraz (IV) wzrost szczytowy włosników. W każdy z etapów zaangażowanych jest wiele genów, a ich skoordynowane działanie jest odpowiedzialne za prawidłowy przebieg procesu tworzenia włosników (Schiefelbein i inni, 2014; Cui i inni, 2017).

W ostatnich dziesięcioleciach genetyczne i fizjologiczne podstawy ustalania wzoru epidermy korzenia zostały dobrze opisane jedynie w przypadku modelowej rośliny dwuliściennej *Arabidopsis thaliana*. Poznanie pełnej sekwencji genomu *Arabidopsis* (*Arabidopsis*-Genome-Initiative, 2000) i dostępność kolekcji mutantów insercyjnych, charakteryzujących się zmienioną morfologią strefy włosnikowej, doprowadziły do identyfikacji wielu genów zaangażowanych w wieloetapowy proces powstawania włosników. Ponadto, rozwój badań biochemicznych i narzędzi umożliwiających profilowanie transkryptomu dostarczyły istotnych informacji na temat zmian w ekspresji genów na różnych etapach powstawania włosników, co pozwoliło na lepsze zrozumienie skomplikowanej sieci interakcji pomiędzy genami i czynnikami zaangażowanymi w ten proces (Bruex i inni, 2012). Pomimo istotnej funkcjonalnej roli, jaką odgrywają włosniki, ich rozwój u roślin jednoliściennych nie jest dostatecznie poznany.

Kluczowym etapem różnicowania włosników korzeniowych jest determinacja wzoru ryzodermy i tworzenie dwóch typów komórek: trichoblastów, wytwarzających wypustkę włosnikową oraz atrichoblastów, które nie są zdolne do wytworzenia włosnika. W królestwie roślin wyróżniono trzy główne typy wzorów ułożenia trichoblastów i atrichoblastów (Leavitt, 1904; Dolan i Costa, 2001; Marzec i inni, 2014) (Ryc. 2.1). W przypadku roślin charakteryzujących się pierwszym typem wzoru ryzodermy, trichoblasty i atrichoblasty są nieodróżnialne, a każda komórka ryzodermy jest w stanie wytworzyć włosnik, jednak nie zawsze ten potencjał jest realizowany. Wzór ten charakteryzuje się przypadkowym rozmieszczeniem włosników wzdłuż korzenia i spotykany jest u wielu gatunków roślin, w tym dwuliściennych, jednoliściennych oraz u paproci (Dolan i Costa, 2001). W drugim typie wyróżnia się dwa rodzaje komórek epidermy korzenia, z których jedynie krótsza komórka jest zdolna rozwijać się w trichoblast, z kolei dłuższa komórka różnicuje się w atrichoblast. Te dwa rodzaje komórek są zwykle tworzone bądź na drodze asymetrycznego podziału komórki macierzystej, bądź w wyniku symetrycznego podziału, po którym następuje

asymetryczne wydłużanie jednej z komórek potomnych. Drugi wzór ułożenia komórek epidermy korzenia występuje głównie w grupach najstarszych roślin lądowych, takich jak *Lycopsidea* lub *Sphenopsida*, w podrodzinach *Pooideae* oraz w rodzinie *Nymphaeaceae* (Cormack 1937; Cutter i Feldman 1970; Cutter i Hung 1972; Marzec i inni, 2013). Z kolei w trzecim typie, komórki tworzą specyficzny przestrzenny wzór gdzie włosniki ułożone są w rzędy rozdzielone jednym lub kilkoma pasmami komórek bezwłosnikowych. Ten typ ułożenia komórek ryzodermy zidentyfikowano u *Brassicaceae*, *Capparaceae*, *Tovariceae*, oraz *Resedaceae* (Dolan, 1996; Kwak i inni, 2007; Horn i inni, 2009).



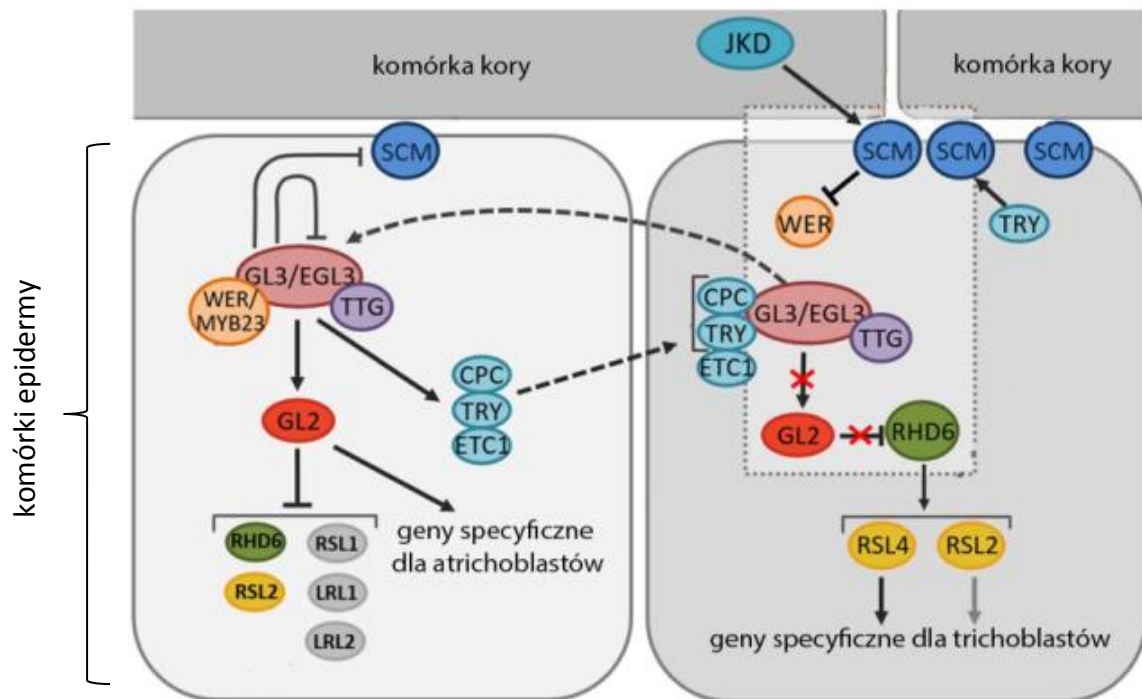
Rycina 2.1. Wzory rozmieszczenia komórek ryzodermy u roślin. (A) Typ I, w którym dowolna komórka epidermy korzenia może wytwarzać włosniki, (B) Typ II, w którym tylko krótsze komórki tworzą włosniki, (C) Typ III, gdzie komórki włosnikowe ułożone są w rzędy rozdzielone jednym lub kilkoma pasmami komórek bezwłosnikowych. (D-E) Dwie możliwości wytwarzania wzoru krótszych i dłuższych komórek: (D) ostatni asymetryczny podział lub (E) asymetryczne wydłużanie komórek potomnych identycznych po symetrycznym podziale (Marzec i inni, 2014; zmodyfikowano).

W budowie morfologicznej korzenia wyróżniono strefy, które składają się z różnych typów komórek, przy czym wszystkie komórki przed rozwinięciem wyspecjalizowanych funkcji i osiągnięciem dojrzałości powstają w merystemie i przechodzą przez kolejne obszary. Strefę merystematyczną, przejściową, różnicowania oraz granice pomiędzy nimi zdefiniowano na podstawie ich charakterystycznych właściwości i aktywności komórkowych (Verbelen i inni, 2006). Różnicowanie komórek epidermy może nastąpić w merystematycznej strefie korzenia podczas podziałów komórkowych lub w obszarze wydłużania korzenia podczas wzrostu komórek. W przypadku typu I rozmieszczenia komórek, morfologiczną różnicą pomiędzy trichoblastami a atrichoblastami jest jedynie obecność lub brak włośnika. Z kolei w typie II i III, trichoblasty są zwykle krótsze, charakteryzują się mniejszym stopniem wakuolizacji oraz bardziej gęstą cytoplazmą, w porównaniu do atrichoblastów (Grierson i inni 2014; Salazar-Henao i inni, 2016).

Do tej pory molekularne mechanizmy różnicowania ryzodermy zostały dość dokładnie opisane dla modelowej rośliny *A. thaliana* (Ryc. 2.2). W przypadku tego gatunku, przyszły los komórek epidermy jest ściśle regulowany przez mechanizm związany z pozycją tych komórek, w stosunku do komórek warstwy kory. Informacja na temat pozycji jest ustalona już we wczesnym etapie rozwoju epidermy (Balcerowicz i inni, 2015). Trichoblasty zlokalizowane są nad antyklinalnymi ścianami kory i mają kontakt z dwiema jej komórkami. Z kolei atrichoblasty znajdują się nad peryklinalnymi ścianami komórek kory i mają kontakt z jedną jej komórką (Dolan i Costa, 2001). Genetyczne podstawy różnicowania komórek epidermy są definiowane przez wzajemne oddziaływanie elementów regulatorowego kompleksu białkowego oraz transport niektórych komponentów pomiędzy trichoblastami i atrichoblastami. U *Arabidopsis* jednym z głównych elementów tego kompleksu jest czynnik transkrypcyjny z homeodomeną GLABRA2 (GL2), który negatywnie reguluje ekspresję genów potrzebnych do rozwoju włośników i promuje tworzenie atrichoblastów. W komórce która nie tworzy włośnika, aktywność genu *GL2* jest pozytywnie regulowana przez kompleks czynników transkrypcyjnych, złożony z białek: MYB, GL3 (GLABRA3), EGL3 (ENHANCER OF GLABRA3) oraz TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1). Białko typu MYB, kodowane przez gen *WEREWOLF* (*WER*) posiada miejsce wiązania DNA oraz domenę aktywującą transkrypcję białek GL3 oraz EGL3. Białka GL3 oraz EGL3 zawierają domeny bHLH (basic Helix-Loop-Helix). Z kolei białko TTG1 zawiera domenę z powtórzeniami typu WD40, zaangażowanymi w tworzenie interakcji pomiędzy białkami (Schiefelbein i inni, 2009). W przypadku trichoblastów, ekspresja genu *WER* jest hamowana przez gen *SCM* (*SCRAMBLED*), który koduje kinazę i jest zaangażowany w proces

prawidłowego odbioru informacji pozycyjnej z komórek kory. *SCM* jest indukowany przez białko z motywem palca cynkowego, będące produktem genu *JACKDAW* (*JKD*) (Hassan i inni, 2010). Wykazano również, że gen *TORNADO1* (*TRN1*), kodujący białko z powtórzeniami bogatymi w leucynę, może powodować hamowanie ekspresji genu *WER* w trichoblastach (Kwak i inni, 2015). W efekcie, negatywna regulacja genu *WER* powoduje, że białko *WER* jest zamienione w kompleksie *WER-GL3/EGL3-TTG1* przez inne białka typu MYB: *CAPRICE* (*CPC*), *TRYPTICHON* (*TRY*) i *ENHANCER OF TRY AND CPC1* (*ETC1*), w wyniku czego powstaje kolejny kompleks transkrypcyjny: *CPC/TRY/ETC1-GL3/EGL3-TTG1* (Schiefelbein i inni, 2014). W efekcie ekspresja *GL2* nie jest już wspierana, co powoduje aktywację genów sprzyjających rozwojowi włosników. Co więcej, gen *SCM* podlega procesowi autoregulacji na zasadzie pętli sprzężenia zwrotnego, w której jest negatywnie regulowany przez geny *WER* oraz *GL3* w atrichoblastach, a pozytywnie przez gen *TRY* w trichoblastach (Schiefelbein i inni, 2014).

W procesie tworzenia wzoru ryzodermy duże znaczenie ma transport białek pomiędzy jej komórkami. Czynniki stymulujące tworzenie komórek określonego typu mogą wzmacniać ekspresję inhibitorów, które mogą być transportowane do sąsiadujących komórek, gdzie blokują ekspresję aktywatorów. Dlatego też produkt genu *CPC* może przemieszczać się z atrichoblastów do komórek włosnikowych, z kolei w przeciwnym kierunku wędrują *GL3* i *EGL3*, gdzie tworzą kompleks z *WER* i wzmacniają ekspresję *CPC* (Salazar-Henao i inni, 2016; Balcerowicz i inni, 2015). Do genów uczestniczących w procesie powstawania włosników u *A. thaliana* należą również geny *LRL*, obejmujące zarówno pozytywne regulatory, jak i represory tworzenia włosników oraz gen *RHD6* (*ROOT HAIR DEFECTIVE6*; *RSL*) (Lin i inni, 2015), który stanowi element ścieżki przekazywania sygnałów hormonalnych (Bruex i inni, 2012). Analiza sekwencji promotorowej genów *LRL* oraz *RHD6* wykazała obecność motywu, który stanowi miejsce przyłączenia się czynnika *GL2*, w związku z czym autorzy postulują, iż białko *GL2* negatywnie reguluje nie tylko *RHD6*, ale także inne geny bHLH takie jak *RHD6-LIKE1* (*RSL1*), *RSL2*, *LRL1* i *LRL2* (Lin i inni, 2015).



Rycina 2.2. Mechanizm ustalania wzoru ryzodermisy u *Arabidopsis*. Strzałki, linie zakończone prostą kreską oraz linie przerywane wskazują odpowiednio regulację pozytywną, negatywną oraz wewnątrz- i międzykomórkowy transport białek. WER – WEREWOLF WER, GL3 – GLABRA3, EGL3 – ENHANCER OF GLABRA3, SCM – SCRAMBLED, JKD – JACKDAW, TRN1 – TORNADO1, GL2 – GLABRA2, CPC – CAPRICE, TRY – TRYPTICHON, ETC1 – ENHANCER OF TRYI CPC1, RSL – ROOT HAIR DEFECTIVE SIX-LIKE (Balcerowicz i inni, 2015; zmodyfikowano). Działanie poszczególnych elementów omówiono w tekście powyżej.

Niewielka jest wiedza na temat genetycznych podstaw przebiegu procesu formowania wzoru ryzodermisy u roślin jednoliściennych. Analizy porównawcze w zakresie badań transkryptomu oraz filogenetyki, przeprowadzone dla wybranych przedstawicieli roślin jednoliściennych, dwuliściennych oraz widłaków wykazały, że większość genów, które prawdopodobnie mogą brać udział w procesie determinacji wzoru ryzodermisy, charakteryzuje podobna struktura i wzór ekspresji u tych grup roślin (Huang i inni, 2017). Zidentyfikowano jednak również grupy genów, które różnią się zarówno w strukturze jak i we wzorze ekspresji między roślinami jedno- i dwuliściennymi (Zheng i inni, 2016; Huang i inni, 2017).

Wśród roślin jednoliściennych scharakteryzowano niewiele mutantów, które wykazują zaburzenia w procesie formowania wzoru ryzodermisy. W przypadku jęczmienia, takimi mutantami są *brb* (*bald root barley*) oraz *rh11* (*root hairless 1*). Spontaniczny mutant *brb* wywodzi się z odmiany ‘Pallas’, która wykazuje prawidłową morfologię strefy włóśnikowej (Gahoonia i inni, 2001). Z kolei w badaniach prowadzonych w Katedrze Genetyki Uniwersytetu Śląskiego zidentyfikowano alleliczne mutanty bezwłóśnikowe (*rh11.a*, *rh11.b*)

uzyskane z odmiany 'Karat' na drodze mutagenezy chemicznej (Szarejko i inni, 2005). Wykazano, że również mutanty *brb* oraz *rh11.b* są alleliczne (Chmielewska i inni, 2014). Różnicowanie trichoblastów i atrichoblastów u *H. vulgare* następuje na drodze niesymetrycznego wydłużania się komórek potomnych powstałych po symetrycznym podziale (Marzec i inni, 2013), przy czym krótsze komórki o zmienionym obrazie ultrastruktury stają się trichoblastami. Analiza strefy włosnikowej jęczmiennych mutantów *brb* oraz *rh11.b* wykazała, że komórki ryzodermy są jednorodne pod względem morfologicznym, biorąc pod uwagę ich długość i gęstość cytoplazmy, w odróżnieniu od odmian wyjściowych 'Karat' i 'Pallas', dla których w strefie wydłużenia korzenia wyróżniono dwie klasy komórek - dłuższe i krótsze. Krótsze komórki o gęstszej cytoplazmie i większej liczbie mitochondriów stanowiły $46,0 \pm 1,4\%$ oraz $47,3 \pm 2,8\%$ populacji komórek włosnikowych odpowiednio dla odmiany 'Karat' i 'Pallas'. Długość komórek ryzodermy w strefie włosnikowej u odmiany 'Karat' została oszacowana na $119,5 \pm 38,2 \mu\text{m}$ i $234,3 \pm 37,6 \mu\text{m}$ odpowiednio dla trichoblastów i atrichoblastów. W przypadku mutantu *rh11.b* średnia długość komórki ryzodermy wynosiła $219,1 \pm 50,4 \mu\text{m}$ w porównywalnej strefie korzenia (Marzec i inni, 2013).

Z kolei Ding i współpracownicy (2009) opisali mutantu ryżu *Osrh11*, u którego w procesie formowania wzoru ryzodermy nie występuje wyraźne tworzenie krótszych i dłuższych komórek, charakterystycznych dla typu dzikiego. Jednakże w przeciwieństwie do bezwłosnikowych mutantów *brb* oraz *rh11* mutant ryżu *Osrh11* tworzy silne skróconych włosniki. Ze względu na fakt, iż wszystkie wymienione mutanty zarówno u ryżu, jak i jęczmienia, wykazują istotne zaburzenia w procesie formowania wzoru ryzodermy, zmiany leżące u podstaw opisanych fenotypów prawdopodobnie związane są z genami działającymi na wczesnych etapach powstawania włosników korzeniowych.

Co ciekawe, analizy histologiczne epidermy korzeni prowadzone m.in. dla *H. vulgare*, *O. sativa* oraz *B. distachyon* wykazują pewne różnice podczas różnicowania trichoblastów w stosunku do jęczmienia, co oznacza że proces formowania wzoru ryzodermy może nie być ściśle konserwowany w grupie roślin jednoliściennych. W przypadku ryżu, podobnie jak u jęczmienia, obserwowano symetryczny podział komórki ryzodermy, a po podziale szybszy wzrost wydłużeniowy jednej z komórek potomnych, która stawała się atrichblastem nie wytwarzającym włosnika (Kim i Dolan, 2011). Z kolei, u *B. distachyon*, po asymetrycznym podziale komórki, jedynie krótsza komórka potomna wytwarzała włosnik. W przypadku jęczmienia i ryżu, po podziale komórki, niezidentyfikowany jak dotąd sygnał kieruje różnicowaniem komórek potomnych, podczas gdy u *B. distachyon*, czynnik wpływający na

kontrolę ustalenia tożsamości komórek wydaje się być aktywowany już przed ostatnim podziałem (Kim i Dolan; 2011; Kim i Dolan; 2016). Prawdopodobnie, mechanizm związany z wczesnym etapem powstawania włosników jest ściśle zależny od czynników powiązanych z asymetrycznym podziałem i rozwojem komórek potomnych.

Wykazano, że rozwój włosników u roślin jednoliściennych związany jest z ekspresją grupy genów, której członkowie kodują czynniki transkrypcyjne. Geny te, zidentyfikowane u *B. distachyon* (*BdRSL1*, *BdRSL2* i *BdRSL3*) i *O. sativa* (*OsRSL1*, *OsRSL2* i *OsRSL3*), stanowią pozytywne regulatory rozwoju włosników, podobnie jak u *A. thaliana* (Kim i inni, 2017). Jednakże wykazano różnice we wzorach ekspresji genów *RSL I* pomiędzy *A. thaliana* a *B. distachyon* i *O. sativa*. Geny *RSL* opisane u traw i należące do klasy I, ulegają ekspresji wkrótce po asymetrycznym podziale w komórkach tworzących przyszłe włosniki. Natomiast u *A. thaliana* geny należące do homologicznej grupy *RSL* (*AtRHD6* i *AtRSL1*) ulegają ekspresji już w dzielących się komórkach w merystemie korzenia, a nie wykryto ich ekspresji w komórkach z wydłużonymi włosnikami. Należy zaznaczyć, że komórki epidermy korzenia stają się morfologicznie zróżnicowane stosunkowo późno w przypadku *B. distachyon* i *O. sativa*, w porównaniu do *A. thaliana*, gdzie różnica pomiędzy krótszymi i dłuższymi komórkami jest widoczna już w merystemie. Z tego powodu proponuje się, że czas ekspresji genów *RSL* klasy I u *B. distachyon* i *O. sativa* jest skorelowany z morfologicznym różnicowaniem tych dwóch typów komórek ryzodermy (Dolan, 2017).

Wykazano, że różnicowanie komórek jest skorelowane z ograniczeniem komunikacji symplastowej między sąsiadującymi komórkami (Kim i inni, 2002). Proces symplastowej komunikacji jest zależny od obecności plazmodesm czyli cytoplazmatycznych kanałów wewnątrz ścian komórkowych sąsiadujących komórek (Lucas i inni, 2009). Plazmodesmy są strukturami regulującymi przepływ cząsteczek między komórkami roślin (Crawford i Zambryski, 2001) i stanowią one miejsce transportu białek oraz RNA (Oparka i Cruz 2000; Jorgensen, 2002; Ruiz-Medrano i inni, 2001). Analiza bezwłosnikowego mutantu jęczmienia *rhll.a* oraz jego formy wyjściowej 'Karat' wykazała, że symplastowa łączność jest ograniczona u formy rodzicielskiej, zarówno w strefie elongacyjnej jak i strefie różnicowania korzenia. W przypadku mutantu *rhll.a*, ze względu na znacznie zmniejszony poziom depozycji kalozy w plazmodesmach, nie obserwuje się symplastowej izolacji sąsiadujących ze sobą komórek epidermy (Marzec i Kurczyńska, 2014). Wyniki te pokazują, że u jęczmienia komunikacja symplastowa ma istotne znaczenie w trakcie różnicowania trichoblastów i atrichoblastów.

Skomplikowany proces formowania wzoru ryzodermy, oraz uboga wiedza odnośnie czynników zaangażowanych w jego przebieg u roślin jednoliściennych, jednoznacznie ujawniają potrzebę rozwinięcia badań w celu zgłębienia wiedzy na temat mechanizmów prowadzących do wytwarzania włosników w tej grupie roślin.

2.3. Mechanizmy formowania primordium i wzrostu szczytowego włosników u jednoliściennych

Po etapie ustalenia losu komórek epidermy korzenia zachodzą w nich dalsze zmiany, które prowadzą do uformowania włosnika. Zmiany te obejmują m.in. modyfikacje struktury i składu ściany komórkowej trichoblastów, co jest związane z reorganizacją cytoszkieletu, egzocytozą, aktywacją transporterów błonowych jak i ze zmianami hormonalnymi (Bibikova i Girloy, 2003). Podobnie jak w przypadku ustalania wzoru ryzodermy, genetyczne postawy etapu tworzenia primordium włosników nie są dokładnie opisane u roślin jednoliściennych, jednakże proces elongacji włosników został lepiej poznany w tej grupie roślin niż etap różnicowania komórek ryzodermy (Rounds i Bezanilla, 2013). Geny zaangażowane w rozwój wypustki włosnikowej zidentyfikowane u roślin jednoliściennych zamieszczono w tabeli 2.1.

Morfologicznym przejawem formowania się włosników jest tworzenie ich zawiązków na powierzchni korzenia podczas inicjacji. Na tym etapie włosniki przybierają postać bulwki powstającej na powierzchni trichoblastów. Opisano mutantą *rth3* u kukurydzy, u którego wypustka włosnikowa wykazuje zmiany kształtu w porównaniu z typem dzikim (Wen i Schnable, 1994). Za ten fenotyp odpowiedzialny jest gen, którego produkt należy do rodziny białek COBRA (Hochholdinger i inni, 2008). Udowodniono, że u *A. thaliana* białka COBRA są związane m.in. z różnymi typami ekspansji komórek oraz z procesem biosyntezy ściany komórkowej, poprzez wiązanie cząsteczek celulozy (Brady i inni, 2007; Liu i inni, 2013). Proponuje się, że ekspresja genu *RTH3* jest kontrolowana przez gen *RTH5*, którego produkt jest również zaangażowany w rozluźnienie ściany komórkowej przez produkcję rodników hydroksylowych. Po rozluźnieniu ściany, transbłonowe białko RTH6 syntetyzuje celulozę na błonie plazmatycznej. Następnie nowo powstałe cząstki celulozy są wytlączane od wewnętrznej strony ściany komórkowej na szczycie włosnika i w ten sposób wzmacniana jest wypustka, podczas gdy białko RTH3 zakotwiczone przez glikozylofosfatydylinozytol w błonie odpowiada za organizację zsintetyzowanej celulozy (Li i inni, 2015).

Tabela 2.1. Geny zaangażowane w proces wzrostu szczytowego włośników u roślin jednoliściennych potwierdzone badaniami mutantów i/lub linii z nadekspresją genu.

Gatunek	Gen	Kodowane białko	Funkcja genu	Referencje
Jęczmień	<i>HvEXPB7</i>	ekspansyna	rozluźnianie ściany komórkowej	He i inni, 2015
Kukurydza	<i>RTH1</i>	podjednostka egzocystu	polarna egzocytoza	Wen i inni, 2005
	<i>RTH5</i>	oksydaza NADPH	ustalenie wysokiego poziomu ROS w wierzchołku rosnącego włośnika	Nestler i inni, 2014
	<i>RTH3</i>	białko COBRA	organizacja zsyntetyzowanej celulozy / wydłużanie komórek	Hochholdinger i inni, 2008
	<i>RTH6</i>	syntaza celulozy	biosynteza ściany komórkowej	Li i inni, 2016
	<i>OsEXPB5</i>	ekspansyna	rozluźnianie ściany komórkowej	ZhiMing i inni, 2011
	<i>OsRTH1</i>	apyraza	hydroliza ATP	Yuo i inni, 2009
	<i>OsFHI</i>	formina	polimeryzacji aktyny w cytoszkielecie	Huang i inni, 2013b
	<i>OsCLSD1</i>	glukozylotransferaza	synteza celulozy	Kim i inni, 2007; Yuo i inni, 2011
	<i>OsXXT1</i>	ksylozylotransferazę ksyloglukanu	formowanie połączeń celuloza - ksyloglukan	Wang i inni, 2014
Pszenica	<i>TaRSL4</i>	czynnik transkrypcyjny z rodziny białek bHLH	dokładnie niepoznana / kontrola ekspresji genów zaangażowanych w wydłużanie włośników	Han i inni, 2016

Z inicjacją tworzenia włośników u przedstawicieli roślin jednoliściennych wiązać się może także działanie peroksydaz. Trzy geny kodujące enzymy z tej grupy zidentyfikowano na podstawie analizy transkryptomu tkanki korzenia jęczmiennego bezwłośnikowego mutantu *rhl1.a* i jego odmiany wyjściowej (Kwaśniewski i inni, 2010), stwierdzając znaczne obniżenie poziomu ich ekspresji u mutantu w stosunku do formy dzikiej. Jeden z tych genów, *HvPRX45* (*PEROXIDASE 45*) poddano bardziej szczegółowej analizie z wykorzystaniem zarówno mutantu bezwłośnikowego, jak i formy *rhp1.b* (*root hair primordial.b*) wykształcającej włośniki tylko do stadium primordium (Chmielewska i inni, 2014). Hybrydyzacja mRNA *in situ* pozwoliła wykryć transkrypt genu *HvPRX45* w pojedynczych komórkach epidermy korzenia u roślin typu dzikiego oraz u mutantu *rhp1.b*, podczas gdy nie wykrywano ekspresji tego genu w bezwłośnikowym mutancie *rhl1.a*. Sugeruje się, że gen *HvPRX45* może pośrednio uczestniczyć w inicjacji włośników w typie dzikim i w mutancie *rhp1.b* tworzącym

primordia, podczas gdy niedobór rodników hydroksylowy w korzeniach mutantu *rh11.a* może wiązać się z brakiem procesu inicjacji włóśników (Kwaśniewski i inni, 2013).

W kierowaniu wzrostem szczytowym włóśników ważne jest również, wyznaczenie kierunku ekspansji komórek, reorganizacja cytoszkieletu oraz transport pęcherzykowy komponentów ściany komórkowej do szczytu włóśnika. Istotną rolę w tych procesach odgrywa tworzenie gradientów reaktywnych form tlenu (Reactive Oxygen Species; ROS) oraz wapnia (Ketelaar, 2014; Zhou i inni, 2014). Ze względu na fakt, iż wydłużanie komórek wymaga podaży materiałów budulcowych ściany komórkowej, niedobory w syntezie tych związków jak i ich transporcie mogą powodować zahamowanie procesu wzrostu włóśników (Campanoni i inni, 2007). Pierwsze doniesienia o zaangażowaniu syntazy celulozy w wydłużanie włóśników u roślin jednoliściennych dotyczą białka z grupy roślinnych odpowiedników syntaz celulozowych, kodowanego przez gen *OsCSLD1* (*Oryza sativa cellulose synthase-like D1*). Syntazy celulozowe zaliczane są do rodziny glikozylotransferaz, które mogą brać udział w biosyntezie polimerów ściany komórkowej (Li i inni, 2009). Primordia włóśników u mutantu *csl1* są normalnie wykształcone, jednak włóśniki w trakcie wzrostu uzyskują mniejszą długość, przy czym nie stwierdzono różnicy w ich gęstości lub rozmieszczeniu, co sugeruje, że gen *OsCSLD1* bierze udział w procesie elongacji włóśników. Linie z nadekspresją genu *OsCSLD1* charakteryzowały się dwukrotnie dłuższymi włóśnikami, w porównaniu do włóśników wytwarzanych przez rośliny typu dzikiego (Kim i inni, 2007). Gen *OsCSLD1* jest prawdopodobnym ortologiem funkcjonalnym genu *KOJAK/AtCSLD3*, którego produkt zaangażowany jest w syntezę celulozy i jest konieczny na etapie elongacji włóśników u *A. thaliana* (Kim i inni, 2007). Również u ryżu analiza mutantu *rh2* (*root-hairless2*) pozwoliła na zidentyfikowanie genu *OsXXT1*, który koduje enzym 6-ksylozylotransferazę ksyloglukanu i zaangażowany jest w tworzenie wiązań pomiędzy cząsteczkami ksyloglukanu i celulozy (Wang i inni, 2014). Mutacja w genie *OsXXT1*, powoduje nieprawidłowe wydłużenie włóśników korzeniowych.

Inną dużą grupą białek zaangażowanych we wzrost szczytowy są białka z rodziny ekspansyn, które wykazują zdolność do rozluźniania ścian podczas wydłużania komórki. Wykazano, że ekspansyny kodowane przez geny *HvEXPB1* (Kwasniewski i Szarejko, 2006), *OsEXPB5* i *OsEXPA17* (Won i inni, 2010; ZhiMing i inni, 2011) prawdopodobnie są zaangażowane w inicjację oraz wydłużanie włóśników.

Materiał do syntezy ściany komórkowej podczas elongacji włóśników dostarczany jest do szczytowej części komórek za pośrednictwem pęcherzyków, które ulegają egzocytocie. Proces ten jest możliwy dzięki białkowemu kompleksowi egzocystu, zlokalizowanemu po

wewnętrznej stronie błony komórkowej. U kukurydzy opisano gen *RTH1*, który koduje białko homologiczne do podjednostki egzocystu białka Sec3, zidentyfikowanego u drożdży oraz ssaków. Komórki ryzodermy mutantu *rth1* (*root hairless1*) tworzą normalnie wyglądające primordia włóśników, jednak nie ulegają one wydłużeniu. Co istotne, mutacja w genie *RTH1* nie ma wpływu na wydłużenie łagiewki pyłkowej, co sugeruje, że jego funkcja jest specyficzna dla komórek włóśnikowych (Wen i inni, 2005). U *A. thaliana*, mutacja w homologicznym genie *EXO70A1* powoduje efekt plejotropowy w postaci zaburzonego polarnego wzrostu włóśników, skróconych organów (m.in. pędów, liści), utraty dominacji wierzchołkowej oraz powstawania bocznych kwiatostanów zamiast merystemów kwiatowych (Synek i inni, 2006).

Z kolei, analiza mutantu ryżu *rth1* (*root hairless 1*) pozwoliła na identyfikację genu *OsRTH1* kodującego apyrazę, która należy do grupy fosfataz (Yuo i inni, 2009). Zadaniem tych związków jest hydroliza ATP do AMP. U mutantu *rth1* wzrost włóśników zahamowany jest w fazie tworzenia wypustki, dodatkowo mutanty charakteryzuje się skróconym pędem i systemem korzeniowym. Analizy lokalizacji ATP prowadzone dla włóśników *A. thaliana*, *Medicago truncatula* oraz *T.estivum* wykazały, że cząsteczki ATP zlokalizowane były w macierzy pozakomórkowej wierzchołka rosnącej wypustki włóśnikowej (Kim i inni, 2006). Przypuszcza się, że nierównomierny rozkład ATP na powierzchni włóśników jest niezbędny do ustalenia gradientów ROS oraz wapnia (Choi i inni, 2014).

Analiza innego mutantu ryżu (*Ds24419*), który formuje istotnie skrócone włóśniki w porównaniu z typem dzikim, pozwoliła na identyfikację genu *OsSNDP1* (*Sec14-Nodulin Domain-Containing Protein 1*) kodującego białko sygnałowa fosfatydyloinozytolu (Huang i inni, 2013a). Wykazano, że fosfatydyloinozytol stanowi miejscowo specyficzną cząsteczkę sygnałową zlokalizowaną na szczycie włóśnika. Związek ten zaangażowany jest w ustalenie kierunku reorganizacji cytoszkieletu, koniecznego do transportu pęcherzyków (Kusano i inni, 2008). Fenotyp tego mutantu ryżu sugeruje poważne zaburzenie we wzroście szczytowym co prawdopodobnie jest związane z dezorganizacją cytoszkieletu i/lub zaburzonym transportem pęcherzyków (Huang i inni, 2013b).

Również u ryżu opisano gen *OsFHI* (*Formin Homology1*), który koduje białko z grupy formin. Wykazano, że forminy biorą udział w podziale komórek, elongacji organów jak również we wzroście wierzchołkowym (Yang i inni, 2011; Wang i inni, 2012). Białka te odgrywają rolę w procesie organizacji cytoszkieletu poprzez udział w polimeryzacji aktyny (Pei i inni, 2012; Cvrčková i inni, 2015). Należy zaznaczyć, że ekspresja genu *OsFHI* w zmutowanym fenotypie była jednak zależna od warunków środowiska. Rośliny z mutacją

punktową w genie *OsFHI* hodowane na płynnej pożywce wykazywały skrócone włośniki w porównaniu do osobników typu dzikiego, jednak gdy były one hodowane na stałym podłożu różnica w ich długości zanikała. Autorzy postulują, że korzenie mutantów mogą wykazywać większą wrażliwość na niedostatek tlenu charakterystyczny dla pożywek płynnych (Huang i inni, 2013a). Wydaje się więc, że wpływ genu *OsFHI* na wzrost włośników może mieć charakter fakultatywny.

2.4. Klonowanie genów w oparciu o mapę

Ustalenie powiązania pomiędzy sekwencją genu a jego biologiczną funkcją ma znaczenie nie tylko dla zrozumienia podstawowych procesów leżących u podłoża rozwoju i funkcjonowania organizmów, ale również dla wykorzystania tej wiedzy w praktycznej hodowli roślin i zwierząt. Z upływem czasu wdrożono dwie odmienne strategie badania funkcji genów, określone jako ‘forward’ oraz ‘reverse genetics’. Klasyczna strategia (‘forward genetics’) oparta jest na znalezieniu genetycznych podstaw odpowiedzialnych za fenotyp analizowanego osobnika (Peters i inni, 2003; Schneeberger i inni, 2011). Z kolei, odwrotna genetyka (‘reverse genetics’) jest terminem stosowanym dla metod próbujących określić biologiczne funkcje genu o znanej sekwencji przez badanie fenotypu osobników, w których znany gen został zmodyfikowany (Gilchrist i Haughn, 2005; Manzanares i inni, 2016).

Pierwszy etap ustalania funkcji genu w oparciu o klasyczną strategię polega na wyprowadzeniu osobnika niosącego homozygotyczną mutację, objawiającą się jakościową zmianą fenotypu (Schneeberger, 2011). Ważnym elementem procedury jest określenie, czy zmiana generująca nowy fenotyp zaszła tylko w jednym genie, który będzie obiektem badania. Poszukiwanie allelu genu, który jest odpowiedzialny za obserwowany fenotyp jest zazwyczaj wieloetapowym procesem, w którym podstawową stosowaną techniką jest klonowanie w oparciu o mapę. Klonowanie oparte o mapę, zwane inaczej klonowaniem pozycyjnym, jest definiowane jako metoda izolacji genu, będącego przedmiotem zainteresowania, bez wcześniejszej wiedzy o produkcie poszukiwanego genu (Krattinger i inni, 2009).

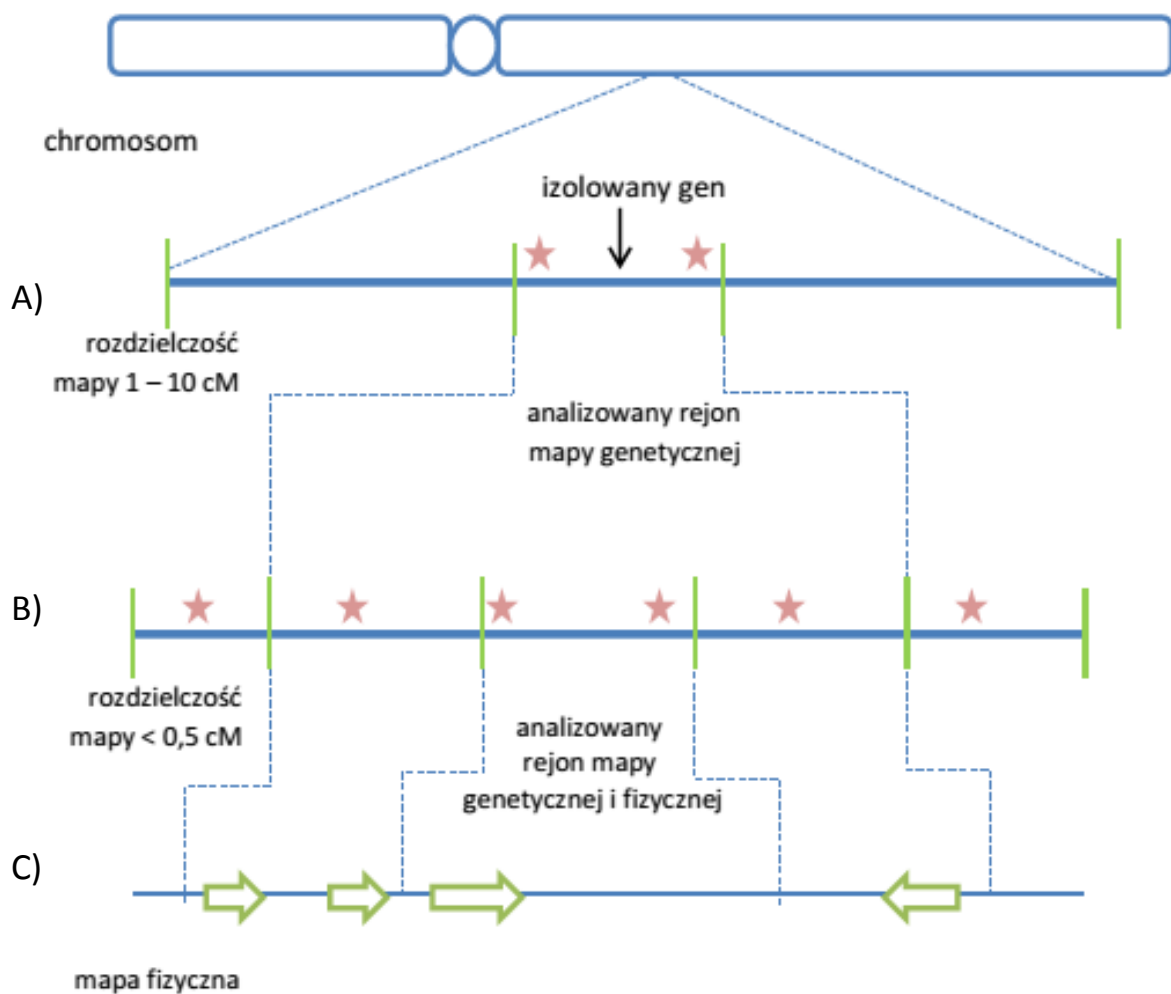
Klonowanie genu na podstawie mapy obejmuje szereg etapów, z których pierwszym jest umiejscowienie genu na mapie genetycznej. Warunkiem wstępnym całej procedury jest dysponowanie dwoma łatwo rozróżnialnymi allelami poszukiwanego genu, z których jeden jest charakterystyczny dla typu dzikiego, a drugi warunkuje fenotyp mutanta. Pozwala to na wyprowadzenie populacji mapującej, której osobniki stanowią materiał do analizy sprzężeń genu odpowiedzialnego za analizowany fenotyp z molekularnymi markerami genetycznymi. Zazwyczaj, w procedurach izolacji genu w oparciu o mapę na początku tworzona jest mapa genetyczna o niskiej rozdzielczości, która posiada markery zlokalizowane w różnych miejscach genomu (Ryc. 2.3). Do utworzenia takiej mapy zwykle stosuje się populacje mapujące o niewielkiej liczebności tzn. 100-250 osobników (Krattinger i inni, 2009). Na ogół na etapie inicjalnego mapowania, odległości między markerami powinny być nie większe niż

25 cM od analizowanego locus, a odległość między markerami najbliższymi flankującymi poszukiwane locus nie większa niż 10 cM (Stein i Graner, 2004).

Informacje uzyskane ze wstępnego etapu mapowania zwykle nie są wystarczające do precyzyjnego określenia położenia genu. Z tego powodu konstruuje się wysokorozdzielczą mapę, która powstaje na podstawie populacji mapującej złożonej z większej liczby roślin. Osobniki poddaje się genotypowaniu z zastosowaniem markerów flankujących badany gen, w celu wyselekcjonowania rekombinantów pomiędzy tymi markerami. Zazwyczaj rekombinanty wykorzystywane są w dalszych etapach, do wysycenia markerami interwału otaczającego analizowany gen, co prowadzi do zlokalizowania nowych sekwencji w jak najmniejszej odległości po obu stronach mapowanego genu (Krattinger i inni, 2009). Kolejnym etapem procedury izolacji genu jest wyznaczenie fizycznego regionu w genomie, w którym zlokalizowane są markery molekularne flankujące badany gen. Pierwsze ze stosowanych w tym celu strategii obejmowały procedury wędrowania po chromosomie (chromosome walking) lub lądowania na chromosomie (chromosome landing), w których do przejścia między mapą genetyczną a fizyczną konieczne było stworzenie biblioteki klonów BAC na bazie genomu badanego mutantu. Łącznikiem między mapą genetyczną a fizyczną była detekcja sekwencji markerów flankujących analizowany gen wśród klonów BAC za pomocą hybrydyzacji lub techniki PCR. W rezultacie, możliwe było wytypowanie pojedynczego klonu lub zestawu klonów uszeregowanych w postaci kontigu, w obrębie którego powinien znajdować się gen docelowy. W ten sposób, na podstawie klonów BAC tworzono mapę fizyczną, w celu wyznaczenia obszaru chromosomowego do typowania genów kandydackich (Schulte i inni, 2011; Krattinger i inni, 2009).

Obecnie, dla wielu gatunków dostępne są informacje o sekwencji genomu, które można wykorzystać do tego etapu pracy. W tym przypadku, warunkiem koniecznym jest wykorzystanie jeszcze w mapowaniu genetycznym takich sekwencji, których położenie fizyczne w genomie jest znane i zastosowanie ich jako markerów do zawężania mapy genetycznej. Procedura rozpoczyna się od identyfikacji polimorfizmu między genotypami rodzicielskim populacji mapującej w obrębie wytypowanych sekwencji z dostępnych map fizycznych zdeponowanych w bazach danych. Zwykle bazuje się w tym przypadku na polimorfizmie pojedynczych nukleotydów (Single Nucleotide Polymorphism; SNP). W dalszej kolejności, polimorficzne markery mapuje się na mapie fizycznej, wyznaczając tym samym, który obszar mapy genetycznej odpowiada konkretnej lokalizacji fizycznej w genomie. Znalezienie dwóch markerów o znanej fizycznej lokalizacji, które będą flankować badany gen, pozwala na wskazanie interwału, w obrębie którego można

wytypować geny kandydackie, opierając się o informacje zdeponowane w bazach danych. W dalszych fazach procedury izolacji genu przeprowadzane jest sekwencjonowanie genów kandydackich z wyselekcjonowanego regionu na fizycznej mapie genomu celem identyfikacji mutacji. W końcowym etapie wykonywana jest weryfikacja biologicznej funkcji genu kandydackiego w celu potwierdzenia, czy zmutowany gen jest odpowiedzialny za obserwowany fenotyp (Krattinger i inni, 2009; Singh i inni, 2015a). Najważniejsze etapy procedury klonowania w oparciu o mapę są szczegółowo omówione w następnych częściach tego rozdziału.



Rycina 2.3. Schemat klonowania pozycyjnego genu: A) konstrukcja mapy genetycznej o niskiej rozdzielczości. B) konstrukcja mapy genetycznej o wysokiej rozdzielczości. C) mapa fizyczna. Czerwone gwiazdki – miejsca zjścia rekombinacji; zielone pionowe linie – marker genetyczny; zielone strzałki – lokalizacja genów na mapie fizycznej (Stein i Graner, 2004; Krattinger i inni, 2009; zmodyfikowane).

2.4.1. Populacje mapujące

Pierwszym krokiem w projektach klonowania w oparciu o mapę jest wyprowadzenie populacji mapującej, czyli segregującego pod względem markerów potomstwa uzyskanego z krzyżowania dwóch rodziców. Jeden z nich zawiera zmutowany allel poszukiwanego genu, który powoduje łatwo rozpoznawalne zmiany fenotypu (Schneeberger, 2011). Rodzice wybrani do krzyżowania powinni być zróżnicowani genetycznie, co jest warunkiem koniecznym, umożliwiającym analizę sprzężeń dla wielu markerów. Z drugiej strony, dystans genetyczny pomiędzy genotypami osobników rodzicielskich nie powinien powodować sterility potomstwa, bądź wysokiego poziomu zaburzeń segregacji markerów (Semagn i inni, 2006; Singh i inni, 2015a). Dla roślin samopylnych najczęściej stosowanymi typami populacji mapujących są: pokolenie F_2 , populacje otrzymane przez krzyżowanie wsteczne z jednym z rodziców (BC - backcross), rekombinacyjne linie wsobne (RIL - Recombinant Inbred Lines), oraz populacje podwojonych haploidów (DH - Doubled Haploids) (Collard i inni, 2005). Populacje F_2 oraz BC są łatwe do uzyskania, a wyprowadzenie dużej liczby osobników wiąże się z relatywnie niewielkim nakładem czasu. Podstawową wadą populacji F_2 jest możliwość tylko jednokrotnego jej wykorzystania, osobniki F_2 segregują w pokoleniu F_3 , co określa się jako nietrwałość genetyczną. Pomimo tej wady, ze względu na prostotę uzyskiwania licznego pokolenia F_2 , ten typ populacji jest bardzo często stosowany w procedurze klonowania w oparciu o mapę (Wei i inni, 1999; Pellio i inni, 2005; Yan i inni, 2006; Nair i inni, 2010; Gill i inni, 2016; Qin i inni, 2015; Ui i inni, 2015; Yoshikawa i inni, 2016; Rizzolatti i inni, 2017). Nietrwałość dotyczy także populacji BC, natomiast populacje linii RIL i DH są genetycznie utrwalone. Linie RIL otrzymywane są poprzez wyprowadzenie pokolenia F_2 , samozapylenie roślin i następnie wybieranie pojedynczego ziarna z każdej samozapylonej rośliny, i powtarzanie tej procedury przez 6-8 pokoleń. W ten sposób, w każdym pokoleniu liczba heterozygot ulega zmniejszeniu, a homozygot wzrasta, aż do uzyskania utrwalonych linii homozygotycznych. Zakłada się, że ósme pokolenie jest blisko w 99,22% homozygotyczne (Singh i inni, 2015a). Osobniki populacji tego typu przechodzą wiele rund mejozy, dlatego charakteryzuje je wysoki stopień rekombinacji, co ma duże znaczenie w tworzeniu map genetycznych o wysokiej rozdzielczości.

Innym rodzajem populacji mapującej jest populacja podwojonych haploidów. Linie DH uzyskuje się na drodze androgenezy w kulturach pylnikowych i izolowanych mikrospor, lub na drodze gynogenezy w kulturach załączni i izolowanych makrospor. Uzyskanie podwojonych haploidów jest również możliwe przez krzyżowanie oddalone i eliminację

chromosomów (Seguí-Simarro i inni, 2008). Linie DH generowane są w krótkim czasie, w ciągu jednego pokolenia i podobnie jak w przypadku linii RIL, populacja DH jest genetycznie utrwalona, co umożliwia jej wielokrotne użycie w różnych badaniach. W projektach klonowania w oparciu o mapę, populacje podwojonych haploidów oraz krzyżówek wstecznych wybierane są jako samodzielna populacja mapująca, bądź jako uzupełnienie bazowej populacji F_2 (Xu i inni, 2017; Ren i inni, 2016; Jost i inni, 2016). Ograniczeniem w wykorzystywaniu populacji DH jest niska wydajność uzyskiwania roślin haploidalnych u niektórych gatunków i zależność efektywności tego procesu od genotypu (Schneider, 2005; Semagn i inni, 2006).

Powodzenie procedury izolacji genów wymaga wystarczająco licznej populacji, a liczebność jest silnie zależna od genetycznej i fizycznej rozdzielczości skorelowanej z częstotliwością rekombinacji (Stein i Graner, 2004). Dla konstruowania mapy szkieletowej o niewielkiej rozdzielczości stosuje się zazwyczaj ok. 100 – 250 osobników w większości analizowanych populacji mapujących (F_2 , BC, RILs bądź DH) (Semagn i inni, 2006; Ferreira i inni, 2006). Jednak w celu klonowania w oparciu o mapę zazwyczaj należy zastosować dużą populację mapującą. Przykładowo, dla pokolenia F_2 jest to najczęściej populacja licząca kilka tysięcy osobników (Krattinger i inni, 2009). Z kolei, w przypadku populacji RIL lub DH, które są homozygotycznymi liniami przedstawiającymi możliwe układy alleli w gametach, można zastosować mniej liczne populacje w porównaniu do populacji F_2 .

Wielkość populacji mapującej w procedurze klonowania pozycyjnego zależy od lokalizacji genu. Precyzyjne wykrycie zdarzeń rekombinacyjnych pomiędzy mapowanymi loci jest znacznie łatwiejsze dla regionów o dużej częstotliwości zjawiska crossing-over, dlatego możliwe jest stworzenie mapy genetycznej o wysokiej rozdzielczości również w oparciu o mniej liczne populacje. Izolacja genu ma największe prawdopodobieństwo zakończyć się sukcesem, gdy odległość flankującego markera od poszukiwanego genu jest praktycznie równa 0 cM, co może wskazywać na sytuację, kiedy marker jest zlokalizowany w sekwencji mapowanego regionu. Często podawana wartość długości przedziału, który wyznaczają markery flankujące docelowy locus i która może zapewnić powodzenie izolacji genów to ok. 0,1 – 1 cM, jednak należy zaakcentować, że jest to odległość umowna. Istotne znaczenie ma fakt, że odległość genetyczna nie jest równa fizycznej odległości dwóch punktów na mapie, w związku z czym mapy genetyczne zbudowane w oparciu o częstotliwość rekombinacji markerów molekularnych, niekoniecznie odzwierciedlają ich fizyczne położenie. Rozkład częstotliwości rekombinacji w genomie jest nierównomierny, a wskaźniki rekombinacji pomiędzy różnymi rejonami mogą różnić się nawet dziesięciokrotnie (Kunzel

i inni, 2000, Akhunov i inni, 2003; Stein i inni, 2000). Jest to spowodowane faktem, iż zjawisko crossing-over występuje rzadziej w rejonach centromerów w porównaniu do obszarów dystalnych chromosomów. Powodem zróżnicowania częstości crossing-over jest nie tylko duże fizyczne naprężenie DNA przy centromerach, które występuje podczas wymiany chromatyd (Talbert i inni, 2010), ale również częsta obecność fragmentów heterochromatyny bliskim centromerowi odcinkach chromosomów. Zwiększona kondensacja chromatyny podczas mejozy może wpływać na wyciszenie rekombinacji (Stapley i inni, 2017). Niedawne doniesienia, oparte na analizie roślin zbożowych sugerują, że zwiększona częstotliwość rekombinacji występuje w miejscach charakteryzujących się niskim poziomem metylacji DNA oraz mniejszą liczbą transpozonów, przy czym są to rejony o wysokiej gęstości występowania genów (Lambing i inni, 2017). Kluczową rolę w wyciszaniu rekombinacji w rejonach centromerowych odgrywają zmiany epigenetyczne heterochromatyny, oraz aktywność genów zaangażowanych w hamowanie tego procesu (Choi i inni, 2017; Underwood i inni, 2018). Z kolei, otwarta struktura chromatyny jest ważną cechą rejonów ze zwiększoną częstotliwością rekombinacji u roślin (Lambing i inni, 2017). W niektórych regionach w genomie może nie dochodzić do rekombinacji na długich dystansach fizycznych i dlatego są one niepodatne na klonowanie oparte na mapach genetycznych. W przypadku genomu jęczmienia podaje się, że ok. 30% genów znajduje się poza dystalnym DNA (Higgins i inni, 2014). Większość sklonowanych do tej pory genów jęczmienia znajduje się w dystalnych obszarach chromosomów, gdzie stosunek odległości fizycznych i genetycznych daje większe szanse na pomyślne zakończenie klonowania pozycyjnego (Ariyadasa i inni, 2014). Istotnym praktycznym zastosowaniem faktu, że zmiana stosunku odległości genetycznej do fizycznej jest zależna od regionu chromosomu jest możliwość wyboru liczebności populacji mapującej. Jeśli badany gen położony jest w rejonie o wysokiej częstości rekombinacji, możliwe jest ograniczenie liczby analizowanych osobników.

2.4.2. Konstrukcja mapy genetycznej

Mapowanie genetyczne polega na określeniu pozycji oraz względnej genetycznej odległości pomiędzy markerami lub genami w chromosomach (Collard i inni, 2005). Mapa genetyczna jest konstruowana na podstawie danych uzyskanych podczas analizy segregacji polimorficznych markerów w populacji mapującej. Analizy związane z markerami DNA opierają się na naturalnie występującym polimorfizmie w obrębie genomów, który jest

podstawą zmienności genetycznej. Zasada klonowania pozycyjnego polega na systematycznym zawężaniu przedziału genetycznego zawierającego mutację odpowiedzialną za fenotyp. Można to osiągnąć przez zastosowanie dostępnych i/lub nowo wygenerowanych markerów genetycznych. W ostatnich 30 latach opisano wiele metod genotypowania, lecz przełomem w rozwoju systemów markerów było wprowadzenie markerów SSR (Simple Sequence Repeats), które charakteryzuje wysoki poziom polimorfizmu oraz kodominacyjny charakter dziedziczenia, ponadto są one szeroko rozpowszechnione w genomach zbóż. Dlatego przez wiele lat markery SSR były szeroko stosowane do mapowania genetycznego (Ramsay i inni, 2000; Varshney i inni, 2007; Liu i inni, 2017). Dzięki opublikowanym mapom genetycznym i ogólnodostępnym bazom danych markery SSR są łatwo dostępne i często służą w pierwszych etapach procedury klonowania genu do tworzenia map o mniejszej rozdzielczości, jak również jako wspólne punkty zakotwiczenia dla map zawierających markery SNP. Dodatkowo, markery SSR stanowią znaczniki służące jako punkty odniesienia, które są pomocne w ustalaniu właściwego ułożenia nowo opracowanych markerów, wprowadzanych na wysokorozdzielcze mapy (Mammadov i inni, 2012).

Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP), stanowią najbardziej rozpowszechnione źródło zmienności DNA i w konsekwencji stały się najpopularniejszym narzędziem w badaniach związanych z izolacją genów w oparciu o mapy sprzężeń (Zhou i inni, 2015). Na przestrzeni ostatnich 10 lat automatyzacja technologii do analizy zmian typu SNP pozwoliła na generowanie map sprzężeń wysyconych wieloma markerami, przy zredukowanym czasie potrzebnym na genotypowanie, w stosunku do poprzednich rozwiązań (Garrido-Cardenas i inni, 2018).

Tworzenie mapy zazwyczaj przeprowadza się za pomocą programów komputerowych takich jak np. JoinMap (Stam i inni, 1993), Mapmaker (Lander i inni, 1987), MapManager (Manly i inni, 2001), Linkage (Lathrop i inni, 1984), LINKAGE MAP (Eppig i Eicher 1983), LINKAGE-1 (Suiter i inni, 1983), GMendel (Echt i inni, 1992) oraz PGRI (Lu i Liu 1995). Konstrukcja mapy obejmuje kilka podstawowych etapów. Pierwsze obejmują oznaczenie, czy analizowane loci nie wykazują zaburzeń w segregacji oraz badanie sprzężeń pomiędzy każdą ich parą. Istotną fazą konstrukcji mapy genetycznej jest ustalenie kolejności markerów należących do tej samej grupy sprzężeń względem siebie. Finalnym etapem tworzenia mapy genetycznej jest ustalenie odległości pomiędzy jej poszczególnymi punktami.

2.4.3. Tworzenie mapy genetycznej o wysokiej rozdzielczości

Po zmapowanie badanego genu i określeniu możliwie blisko z nim sprzężonych, flankujących markerów molekularnych prowadzi się powiększanie populacji mapującej. Następnie powiększoną populację poddaje się kolejnym analizom, w celu wytypowania nowych markerów, bliżej sprzężonych z analizowanym locus. W przypadku gdy bazą do mapowania jest pokolenie F_2 , stosowane mogą być na tym etapie dwa podejścia.

Pierwsze z nich wykorzystuje strategię analizy zbiorczych pul segregantów (Bulk Segregant Analysis; BSA) (Michelmore i inni, 1991). Metoda BSA opiera się na sporządzeniu dwóch puli DNA z osobników pochodzących z populacji mapującej. Przy czym każda z nich zawiera DNA osobników takich samych pod względem analizowanej cechy tzn. jedna pula obejmuje rośliny o fenotypie dzikim, a druga zmutowanym. Pule poddawane są genotypowaniu za pomocą tych samych markerów molekularnych w celu identyfikację polimorficznych markerów sprzężonych badaną cechą. Markery sprzężone z analizowaną cechą będą przejawiać nadreprezentację zmutowanego allelu rodzicielskiego tylko w puli utworzonej z osobników o fenotypie mutanta.

Bardziej precyzyjną alternatywą dla metody BSA jest wykorzystanie rekombinantów między badanym genem a flankującymi go markerami, które mogą stanowić podstawę do poszukiwania nowych markerów, jeszcze bliżej sprzężonych z genem. Typowanie nowych markerów wymaga dysponowaniem ich źródłem. Jednym z nich mogą być opracowane mapy sprzężeń, które charakteryzują się wysoką gęstością markerów (dla jęczmienia np. Rostoks i inni, 2005; Varshney i inni, 2007; Close i inni, 2009; Zhou i inni, 2015). Kolejne źródło markerów stanowią bazy danych zawierające informacje o sekwencjach. Przykładowo Mayer i współpracownicy opublikowali sekwencje genomu jęczmienia i umieścili 68% z 32 000 genów w konkretnym chromosomie (Mayer i inni, 2009; Mayer i inni, 2012). Ten uporządkowany i bogaty w informacje szkielet wirtualnego genomu jęczmienia, znany jako Genome Zipper, zapewnił źródło do rozwoju markerów molekularnych dla projektów wysokorozdzielczego mapowania w docelowym regionie genów kandydackich. Niedawno liniowy, wirtualny model uporządkowania genów, został zastąpiony przez zbiór genetycznie, fizycznie i funkcjonalnie opisanych sekwencji jęczmienia, które stanowią fizyczną mapę genomu, zapewniając kolejne źródło do typowania nowych markerów genetycznych. Po wytypowaniu nowych markerów w oparciu o wybrane źródła przeprowadza się dla nich analizę polimorfizmu pomiędzy osobnikami rodzicielskimi populacji mapującej. Następnie przeprowadzana jest analiza segregacji tych markerów w grupie wytypowanych

rekombinantów, poszukuje się takich markerów, które wykazują najrzadszą częstotliwość zrekombinowanego układu w stosunku do analizowanego locus. Jeżeli wszystkie wytypowane rekombinanty charakteryzujące się zmutowanym fenotypem wykazują ten sam homozygotyczny genotyp dla miejsca markera, może świadczyć to o tym, że marker jest zlokalizowany w bardzo bliskim sąsiedztwie poszukiwanego genu, ewentualnie sekwencja markera stanowi część tego genu.

W niektórych pracach badawczych ukierunkowanych na izolację genu w oparciu o mapę stosuje się jeszcze jedno podejście w celu poszukiwania nowych markerów bardzo blisko sprzężonych z badanym genem. Jest ono oparte o linie bliskoizogeniczne (Near Isogenic Lines, NILs). Warto podkreślić, że stosowanie linii NIL nie musi ograniczać się tylko do etapu mapowania szczegółowego, ale może też od razu stanowić punkt wyjścia dla całej procedury izolacji genów. Linie NIL uzyskuje się w wyniku prowadzenia serii krzyżowań wstecznych, wykorzystując roślinę homozygotyczną pod względem poszukiwanego locus oraz formę dziką. Potomstwo F_1 uzyskane w wyniku krzyżowania tych form, krzyżuje się wstecznie z rodzicem wykazującym fenotyp typu dzikiego. Kolejno, przeprowadza się selekcję form, które posiadają zmianę fenotypową, ale równocześnie zachowują jak największą liczbę cech formy dzikiej. Wyselekcjonowane osobniki wykorzystywane są do kolejnej krzyżówki z formą rodzicielską, a ich potomstwo poddaje się kolejnej selekcji. W trakcie kolejnych krzyżówek wstecznych, w każdym następnym pokoleniu część materiału genetycznego mutanta wypierana jest przez genotyp formy dzikiej. W związku z tym każde następne pokolenie traci segment genomu mutanta niepowiązany z badaną cechą poprzez jego odsegregowanie, z kolei obszar związany z tą cechą jest zawężany. W efekcie, możliwe jest znalezienie loci, które wykazują bardzo bliskie sprzężenie z poszukiwanym genem, ponieważ większość polimorficznych loci pomiędzy formami dotyczy wyselekcjonowanej części genomu mutanta (Ngu i inni, 2014; Xiao i inni, 2016).

Powyższe analizy populacji mapujących pozwalają, aby docelowy region został wysycany dodatkowymi markerami molekularnymi otaczającymi badany gen w znacznie mniejszych odległościach, niż w mapowaniu wstępnym.

2.4.4. Fizyczna mapa i identyfikacja genów kandydackich

Skuteczna izolacja genu w procedurze klonowania w oparciu o mapę wymaga określenia fizycznego regionu DNA obejmującego przedział, który został zidentyfikowany za pomocą markerów flankujących poszukiwane locus, podczas etapu mapowania genetycznego.

Aby etap ten zakończył się sukcesem, należy dysponować mapą fizyczną wytypowanego regionu genomu, która jest uporządkowanym zestawem fragmentów DNA, a odległości na takich mapach opisane są w jednostkach fizycznych tzn. w parach zasad.

W przeszłości, kiedy mapy fizyczne genomów dla wielu gatunków nie były dostępne, metodami prowadzącymi do ich konstrukcji były wędrówka po chromosomie (chromosome walking) oraz lądowanie na chromosomie (chromosome landing) (Kubát, 2007). Do przeprowadzenia obu procedur konieczne było dysponowanie biblioteką insertów genomowego DNA w klonach BAC. Wędrówka po chromosomie oparta jest na identyfikacji klonów, które posiadają sekwencje DNA zlokalizowane pomiędzy markerami flankującymi poszukiwane locus. W procedurze wykonuje się serię hybrydyzacji między sekwencją markera, użytą jako sondą, a klonami BAC, celem identyfikacji pozytywnych klonów, które szereguje się w nieprzerwaną sekwencje DNA czyli kontigi, odzwierciedlają taki układ, jaki występuje w genomie. Z kolei metoda lądowania na chromosomie może być stosowana w przypadku, gdy mapa genetyczna jest na tyle zagęszczona markerami, że umożliwia identyfikację markerów flankujących poszukiwany gen w obrębie pojedynczego klonu BAC. W tej procedurze sekwencje markerów flankujących stanowią sondy do przeszukiwania biblioteki insertów, celem znalezienia takiego klonu, który zawiera sekwencję tych markerów, a zatem prawdopodobnie również poszukiwany gen. Ostatecznie, wytypowany rejon zlokalizowany między markerami flankującymi poddawany jest sekwencjonowaniu i typowaniu genów kandydackich (Stein i Graner, 2004).

Obecnie opisane strategie konstrukcji map fizycznych straciły na znaczeniu. Informacja o sekwencji genomu, dostępna dla coraz większej liczby gatunków, oraz dostępność wysokoprzepustowych technologii sekwencjonowań w projektach nad mapowaniem genów istotnie zmieniają klonowanie pozycyjne, ponieważ pozwalają na pominięcie najbardziej pracochłonnego i czasochłonnego końcowego etapu procedury, tzn. konstrukcji mapy fizycznej. W takim przypadku, markery flankujące mogą bezpośrednio wyznaczyć fizyczny region genomu i bazując na informacji o jego sekwencji można doprowadzić do bezpośredniego typowania genów kandydackich, których ekspresja może leżeć u podłoża analizowanej cechy (Ariyadasa i inni, 2014).

Przykładowo mapa fizyczna jęczmienia została skonstruowana na podstawie całkowicie zsekwencjonowanych długich odcinków DNA tzw. „rusztowań”, na które składają się zachodzące na siebie kontigi, z kolei ich grupy są rozdzielone przerwami (ang. gap). Mapa fizyczna genomu jęczmienia reprezentuje 4,79 Gpz, co w przybliżeniu stanowi 95% sekwencji genomowej, z której 4,54 Gpz zostało przypisanych do dokładnych lokalizacji

w chromosomach. Co istotne aż 3,9 Gpz zostało zakotwiczone do wysokorozdzielczej mapy genetycznej (The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012). Markery genetyczne skojarzone z mapą fizyczną dają nowe możliwości w pracach związanych z wyborem genów kandydackich praktycznie w dowolnym rejonie w genomie jęczmienia. Na opracowanej mapie fizycznej genomu jęczmienia opisano 26159 genów oraz wskazano sekwencje homologiczne do innych gatunków (Mascher i inni, 2017). W projektach nad izolacją genów, po określeniu genetycznego interwału, w którym zlokalizowany został poszukiwany gen, informacje o adnotacjach umożliwią identyfikację genów kandydackich.

Ostatnie etapy klonowania pozycyjnego, polegają na identyfikacji genu zawierającego mutację oraz potwierdzeniu jego roli w wykształceniu fenotypu mutantu. W celu identyfikacji genu czasem prowadzi się analizę *in silico* z zastosowaniem różnych aplikacji komputerowych. Analiza wytypowanej sekwencji najczęściej jest oparta na porównywaniu jej z bazami danych, w których zgromadzone są informacje o sekwencjach genomowych, mRNA oraz aminokwasowych dla badanego lub pokrewnych gatunków. Pozwala to na opis struktury analizowanego interwału. W najprostszym przypadku, region który został wytypowany na fizycznej mapie genomu, zawiera pojedynczy gen, co może wyraźnie wskazywać na udział tego genu w badanym procesie. Na przykład, w badaniach nad identyfikacją genu *ra3*, zaangażowanego w rozwój struktury kwiatostanów męskiego i żeńskiego u *Z. mays*, po zawężeniu potencjalnego regionu genomowego do 0,2 cM, co korespondowało z sekwencją o długości 6 kpz na mapie fizycznej, stwierdzono, że zawiera ona jeden gen kodujący enzym z grupy tetraloz, zaangażowany w badany proces (Bortiri i inni, 2006). Jednak w większości badań, region genomowy wytypowany przez flankujące markery zawiera więcej niż jeden gen, w takim przypadku wszystkie geny zlokalizowane w typowanym rejonie poddaje się sekwencjonowaniu. Najlepszy gen kandydacki powinien charakteryzować się różnicą w sekwencji i/lub w poziomie ekspresji pomiędzy mutantem, a jego formą wyjściową. Ponadto, ekspresja kandydata powinna występować w tkance lub organie dla których obserwuje się zmienioną cechę podczas badanego stadium rozwojowego lub być indukowana odpowiednimi bodźcami. Pomocne jest także sekwencjonowanie wytypowanych genów u allelicznych mutantów. Dla najbardziej obiecującego genu kandydackiego sekwencja alleli mutantów powinna nieść zmianę w porównaniu do ich odmian wyjściowych. Takie podejście zostało wykorzystane np. dla *O. sativa* w izolacji genu *CYP81A6* kodującego monooksygenazę cytochromu P450 (Pan i inni, 2006) oraz genu *OsCCD8*, którego produkt białkowy bierze udział w syntezie brasinosteroidów (Yuan i inni, 2013).

W procesie analizy potencjalnego genu kandydackiego nie bez znaczenia pozostają informacje zebrane w publikacjach naukowych oraz internetowych bazach danych. Przykładem popularnej i rozbudowanej bazy danych jest Ensembl Plants (<https://plants.ensembl.org/index.html>), w której zdeponowano informacje dla tych gatunków roślin, dla których dostępna jest kompletna lub prawie kompletna sekwencja genomu. Baza gromadzi wszystkie dostępne dane dotyczące sekwencji genomu, w tym pozycje chromosomowe znanych lub przewidywanych genów, EST oraz sekwencji homologicznych dla innych gatunków. Baza zapewnia graficzny interfejs dla użytkownika, pozwalający na przeglądanie danych sekwencji wraz z ich adnotacją. Typowanie najbardziej prawdopodobnego genu kandydata można poprzeć analizą genomiki porównawczej, która pozwala na wykazanie związku pomiędzy genomami na podstawie konserwatywnych lub homologicznych regionów chromosomów między pokrewnymi gatunkami. W efekcie, sekwencje genomowe oraz aminokwasowe genów zidentyfikowanych w regionie wyznaczonym przez flankujące markery można wykorzystać w celu poszukiwania genów homologicznych o znanych funkcjach w genomach gatunków spokrewnionych.

Ponadto, czasem sekwencję całego wytypowanego regionu, w którym poszukiwany jest gen kandydat, porównuje się z odpowiednim regionem chromosomowym u spokrewnionych gatunków, dla których zidentyfikowano zjawisko konserwowanej synteni, odzwierciedlającej ko-lokalizację grup genów związanych z ewolucyjnie pokrewnymi segmentami chromosomowymi. Taka analiza porównawcza może pozwolić na identyfikację genu, który może pełnić podobną funkcję u analizowanego mutantu. Dla jęczmienia najczęściej analizuje się synteniczne zależności z genomem *O. sativa* lub *B. distachyon* (Okagaki i inni, 2013). Jednak w wielu przypadkach homologiczne geny zostały utracone przez nagromadzenie niewielkich delecji lub translokacje do innego regionu, co stanowi poważne ograniczenie dla wykorzystania zjawiska synteni w identyfikacji genu kandydackiego. Przykładowo, podczas izolacji genu tolerancji na bor, zlokalizowany w chromosomie 4H u jęczmienia, zidentyfikowało region synteniczny o długości 11,2 kbp w chromosomie Os3 u ryżu. Pomimo wysokiego poziomu kolinearności, czyli zachowania porządku ułożenia genów w syntenicznym regionie pomiędzy chromosomem 4H i Os3, nie zidentyfikowano ortologa genu *BORI* w chromosomie 3 z ryżu (Fleury i inni, 2012).

Powyższe metody, choć pozwalają na bardzo dobre uprawdopodobnienie roli genu kandydackiego w wykształcenie badanego fenotypu i są szczególnie przydatne w przypadku gatunków, dla których nie opracowano efektywnego systemu transformacji, nie pozwalają na dostarczenie ostatecznego dowodu co do funkcji wytypowanego kandydata w badanym

procesie. Najbardziej bezpośrednim dowodem na potwierdzenie, biologicznej funkcji genu jest komplementacja genetyczna, czyli wprowadzenie do mutantu konstruktów zawierających allel odmiany wyjściowej (w przypadku mutacji recesywnej), lub allelu zawierającego mutację dominującą, do odmiany wyjściowej. Pozytywny wynik testu komplementacji dowodzi funkcji wytypowanego genu w badanym procesie. Weryfikację genu kandydata można również przeprowadzić poprzez transformację formy wyjściowej konstruktem zawierającym antysensowny RNA, w celu wyciszenia badanego genu. Po stworzeniu linii z wyciszonym genem analizuje się zmiany fenotypu pozwalające ocenić funkcję badanego genu.

2.5. Zastosowanie klonowania genów w oparciu o mapę u jęczmienia

Metoda klonowania genów w oparciu o mapę była często używana od początku lat osiemdziesiątych w badaniu genów u ludzi (Botstein i Risch, 2003) oraz zwierząt, natomiast dla roślin, system ten został opracowany dopiero w ostatniej dekadzie XX wieku (Stein i Graner, 2004). W 1997 roku sklonowano gen *mlo* (*mildew resistance locus o*) warunkujący odporność na mączniaka właściwego (*Erysiphe graminis*) i był to pierwszy gen jęczmienia, który wyizolowano przy użyciu klonowania w oparciu o mapę (Buschges i inni, 1997). Przykładami genów jęczmienia wyizolowanymi z zastosowaniem strategii klonowania pozycyjnego są geny zaangażowane w odpowiedź na patogeny, jak również geny warunkujące inne ważne cechy agrobotaniczne, takie jak zawartość amylozy w ziarnach, proces wernalizacji, reakcje na zmiany fotoperiodu lub morfologię rośliny. Tabela 2.2. prezentuje listę przykładowych genów jęczmienia, wyizolowanych w oparciu o mapę genetyczną.

Pomimo, że wiele genów u jęczmienia zostało wyizolowanych przy użyciu map genetycznych, procedura nadal stanowi trudne wyzwanie. W ostatnich latach rozwinięto metody wysokowydajnego sekwencjonowania jako strategię pomocne w izolacji genów, zwłaszcza w odniesieniu do dużych i skomplikowanych genomów traw.

Tabela 2.2. Przykładowe geny jęczmienia wyizolowane w oparciu o mapę genetyczną.

Gen	Kodowane białko	(1) Rodzaj i (2) Liczebność populacji mapującej	Krzyżówka rodzicielska	Użyte markery	Interwał genetyczny / fizyczny między flankującymi markerami	Referencje
<i>mlo</i> (<i>mildew resistance locus o</i>)	białko transbłonowe	(1) pokolenie F ₂ (2) 2022 osobniki	Ingrid Mlo 3 x BC7 Ingrid mlo-3	RFLP, AFLP	0,34 cM / ok. 30 kb	Buschges i inni, 1997; Reinstadler i inni, 2010
<i>Mla</i> (<i>Mildew resistance locus a</i>)	homologi białek CC-NBSLRR (N-terminal coiled-coil, nucleotide binding site, Cterminal leucine-rich repeat protein)	(1) pokolenie F ₂ z krzyżówki linii NIL (2) 1800 osobniki	Franger x Rupee	AFLP, RAPD, RFLP	0,25 cM / 261 kb	Wei i inni, 1999; Zhou i inni, 2001; Halterman i inni, 2003; Halterman i Wise, 2004
<i>Rar1</i> (<i>required for Mlaspecified resistance 1</i>)	białko domenami CHORD, wiążącymi jony cynku	(1) DH (2) ok. 4000 osobniki	Sultan5 x M82; Sultan5 x M100	CAPS	b.d. / 300 kb	Shirasu i inni, 1999
<i>rym4 / rym5</i> (<i>resistance to yellow mosaic 4 / 5</i>)	element eukariotycznego kompleksu translacyjnego	(1) linie RIL uzyskane z pokolenia F ₂ (2) 3886 osobniki	Igri x Franka; Alraune x W122.37-1	CAPS, STS	b.d. / 650 kb	Stein i inni, 2005
<i>Nud</i> (<i>nudum</i>)	czynnik transkrypcji rodziny ERP / homolog białka WIN1 / SHN1 u <i>A. thaliana</i>	(1) pokolenie F ₂ , (2) 2,828 osobników	Haruna Nijo × Kobinkatagi	AFLP	0.64 cM/ b.d.	Taketa i inni, 2008; Taketa i inni, 2006

Tabela 2.2. c.d.

<i>Ppd-H1</i> (<i>PhotoperiodH1</i>)	pseudo-regulator odpowiedzi związany z działaniem zegara biologicznego	(1) populacja BC ₃ (2) 2336 osobniki	Igri x Triumph	brak danych	0,04 cM / b.d.	Turner i inni, 2005
<i>VRN3</i> (<i>Vernalization-3</i>)	białko VRN3 ortolog białka FT (Flowering Time) u <i>Arabidopsis</i>	(1) Linie RIL, (2) 800 osobników	BGS213 (<i>sVrn-H3</i>) x <i>H.vulgare</i> subsp. <i>spontaneum</i>	CAPS	0,2 cM / b.d.	Yan i inni, 2006
<i>Bot1</i> (<i>Boron tolerance 1</i>)	białko z 10-12 helisami transbłonowymi	(1) pokolenie F ₃ z krzyżówki DH (2) 3360 osobniki	Sahara x Clipper	EST-CAPS	0,15 cM / b.d.	Sutton i inni, 2007
<i>Vrs1</i> (<i>Two-rowed spike 1</i>)	czynnik transkrypcyjny HDZIP (homeodomain, leucin zipper motif)	(1) pokolenie F ₂ częściowo z linii BC (2) ok. 5000 osobników	Azumamugi' x 'Golden Promise'; 'Azumamugi' x 'Kanto 'Azumamugi' x 'Hanna' x New Golden M13; Dissa x New Golden; OUH602 x New Golden M13	AFLP, AFLP-STS	0,07 cM / 518 kb	Komatsuda i inni, 2007
<i>Cly1</i> (<i>Cleistogamy 1</i>)	czynnik transkrypcyjny z domenami AP2 (Apetala 2)	(1) pokolenie F ₂ (2) 2652 osobników	Azumamugi x Kanto Nakate Gold	EST	0,06 cM / 7 kb	Nair i inni, 2010
<i>Un8</i> (<i>Ustilago nuda resistance</i>)	kinaza	(1) linie RIL uzyskane z pokolenia F ₄ (2) 4625 osobników	TR09398 × TR07728	EST-SNP	0.108 cM/ b.d.	Zang i inni, 2015
<i>Ror1</i> (<i>Required for mlo-specified resistance</i>)	białko kompleksu SNARE (syntaksyna)	(1) pokolenie F ₂ , (2) 2700 osobników	C69 × Grannenlose Zweizeilige; A89 × Malteria Heda	CAPS, RFLP	0,18 cM/ b.d.	Acevedo-Garcia i inni, 2013

2.5. Metody wysokowydajnego sekwencjonowania jako nowa strategia do izolacji genów

Rozwój metod sekwencjonowania nowej generacji (next generation sequencing, NGS) oraz dostępność sekwencji wielu genomów roślinnych, w tym jęczmienia (The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012), umożliwiły wykorzystanie sekwencji referencyjnych w procedurach klonowania genów opartych na technologii NGS, takich jak SHOREmap (Short-Read Mapping), MutMap oraz MutChromSeq (Mutant Chromosome Sequencing) (Schneeberger i inni, 2009; Abe i inni, 2012; Fekih i inni, 2013; Osowski i inni, 2008; Schneeberger i inni, 2014; Sánchez-Martín i inni, 2016). Metody te wykorzystują procedury bezpośredniej identyfikacji mutacji odpowiedzialnej za analizowany fenotyp, a proces ten odbywa się podczas resekwencjonowania całego lub części genomu. Strategie te są szczególnie dedykowane do identyfikacji recesywnych mutacji wywołanych działaniem mutagenów chemicznych.

Strategie wykorzystujące mapowanie przez sekwencjonowanie można podzielić na trzy grupy, w zależności od rodzaju stosowanej populacji. Pierwsze eksperymenty tego typu były prowadzone w oparciu o populacje F_2 uzyskane w wyniku krzyżowania mutantu z formą o odmiennym tle genetycznym. Metoda oparta na populacji wyprowadzonej w ten sposób i dedykowana dla genomu *Arabidopsis* została nazwana SHOREmap (Schneeberger i inni, 2009). Strategia SHOREmap po raz pierwszy została użyta do identyfikacji mutacji w genie *AT4G35090*, powodującej opóźniony wzrost roślin i zmianę koloru ich liści. Badacze zidentyfikowali zmutowany gen używając puli DNA pochodzącego z 500 osobników o fenotypie mutantu z pokolenia F_2 wyprowadzonego z krzyżówki pomiędzy mutantem z tłem genetycznym ekotypu Columbia (Col-0) i odległym genetycznie ekotypem Landsberg *erecta* (*Ler*) (Schneeberger i inni, 2009).

Druga grupa metod identyfikacji zmutowanego genu przez sekwencjonowanie obejmuje procedury, w których wyselekcjonowany mutant jest poddawany krzyżówce z formą rodzicielską czyli odmianą wykorzystywaną w procesie mutagenезы. Przykładem może być strategia MutMap, która została z powodzeniem zastosowana w przypadku mutantów ryżu charakteryzujących się zwiększoną tolerancją na zasolenie, a w pracy zidentyfikowano mutację w genie *OsRR22* (Takagi i inni, 2015). Innym przykładem zastosowania podejścia MutMap jest izolacja genu *yldf1* (*yellow leaf and dwarf*), w którym mutacja powodowała karłowatość rośliny i przedwczesne starzenie się liści u ryżu (Deng i inni, 2017). Strategia MutMap była wykorzystywana również u innych gatunków np.

Sorghum bicolor prowadząc do izolacji genu *bloomless40* (*bm40*) zaangażowanego w gromadzeniu wosku epikutynularnego (Jiao i inni, 2017).

Trzecia grupa omawianych strategii nie opiera się na mapowaniu genetycznym, którego podstawą jest proces rekombinacji i nie wymaga konstruowania fizycznej mapy. Szczególnie ciekawą jest nowo opracowana metoda MutChromSeq, która wykorzystuje sortowanie chromosomów do zmniejszenia złożoności genomu (Sánchez-Martín i inni, 2016). Procedura wymaga, aby znane było przypisanie poszukiwanego genu do chromosomu, jednak nie ma potrzeby prowadzenia dokładnego mapowania (Steuernagel i inni, 2017). Materiał do sortowania chromosomów uzyskuje się z korzeni roślin pokolenia M_3 analizowanego mutantu oraz roślin formy wyjściowej o fenotypie dzikim. Wyznakowane sondami DNA chromosomy są sortowane przy użyciu cytometrii przepływowej, uzyskane preparaty są poddawane sekwencjonowaniu, a otrzymane odczyty sekwencji porównuje się pomiędzy osobnikiem wyjściowym oraz mutantem, co pozwala na identyfikację genu kandydata. Identyfikacja mutacji leżących u podstaw zmienionego fenotypu u jęczmienia i pszenicy jest szczególnie trudna z powodu ich dużego i złożonego genomu. Skuteczność metody MutChromSeq zaprezentowano na przykładzie izolacji genu *Eceriferum-q* u jęczmienia oraz *Pm2* u pszenicy (Sánchez-Martín i inni, 2016). Gen *Eceriferum-q* jest zaangażowanego w akumulację wosku na zewnętrznych powierzchniach rośliny jęczmienia, z kolei *Pm2* warunkuje odporność na mączniaka. Oprócz zmniejszenia złożoności próbki DNA, która ma być sekwencjonowana, ważną zaletą metody MutChromSeq jest uproszczenie analizy poprzez uniknięcie genów zlokalizowanych na homeologicznych chromosomach w przypadku poliploidalnych gatunków, jak pszenica, oraz paralogów i pseudogenów obecnych na innych chromosomach w przypadku wszystkich gatunków. Ponadto, metoda nie wymaga dysponowania referencyjną sekwencją genomu.

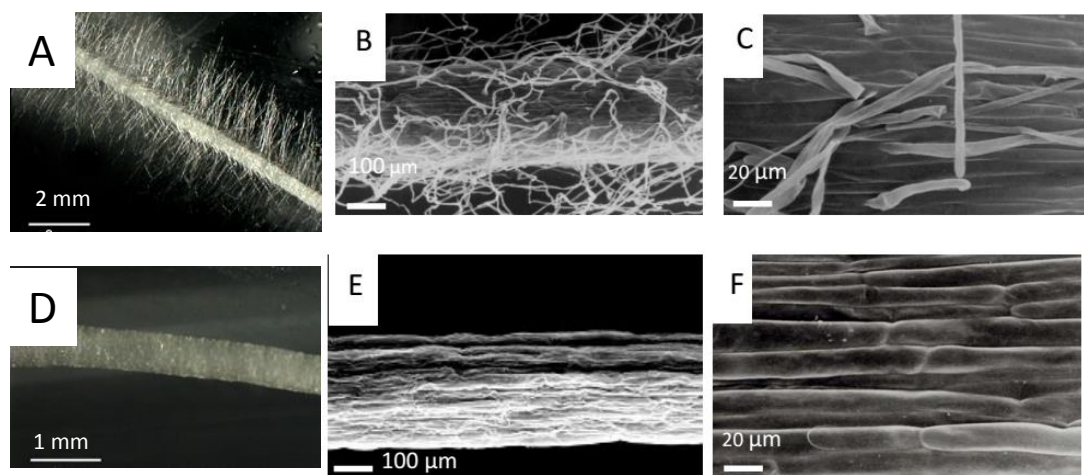
Wprowadzenie metod opartych na sekwencjonowaniu całego genomu bądź jego części, istotnie redukuje trudności związane z czasochłonnym wyprowadzaniem i genotypowaniem dużych populacji mapujących. Czynnikiem limitującym szersze użycie metod mapowania poprzez sekwencjonowanie pozostają duże koszty, jednakże stały rozwój technologii NGS powoduje, że w przyszłości staną się one podstawowym narzędziem do badań funkcji genów, co ma szczególne znaczenie w przypadku cech ważnych agronomicznie u gatunków o dużych genomach.

3. Materiał i metody

3.1. Materiał

Materiał badawczy w pracy stanowił bezwłosnikowy mutant *root hairless 1* (*rh11.b*, gdzie cyfra 1 oznacza locus, a litera *b* allel), wyprowadzony z odmiany ‘Karat’ (Ryc. 3.1). Mutant został uzyskany we wcześniejszych badaniach w Katedrze Genetyki Uniwersytetu Śląskiego poprzez chemiczną mutagenezę, z wykorzystaniem podwójnego traktowania ziarniaków mutagenem MNU (N-metylo-N-nitrozomocznik), w dwóch identycznych dawkach 0,7 mM MNU przez 3 godziny z 6 godzinnym czasem kiełkowania między aplikowaniem dawek mutagenu. Fenotyp mutantu *rh11.b* został opisany jako całkowicie bezwłosnikowy, ryzoderma mutantu wykazuje niezróżnicowany wzór, gdyż jej komórki są jednorodne, tzn. nie można wyróżnić trichoblastów i atrichoblastów (Marzec i inni, 2013; Chmielewska i inni, 2014). Bezwłosnikowy fenotyp mutantu *rh11.b* uwarunkowany jest przez pojedynczym recesywny gen (Szarejko i inni, 2005). Odmiana wyjściowa ‘Karat’ jest europejską odmianą jęczmienia i wykazuje prawidłowo wykształcone włosniki.

Dodatkowo, materiałem badawczym był także bezwłosnikowy, spontaniczny mutant *bald root barley* (*brb*) pochodzący z odmiany ‘Pallas’ (Gahoonia i inni 2001). Wcześniejsze badania ujawniły, że wzór ryzodermy u mutantu *rh11.b* jest identyczny jak u mutantu *brb* (Marzec i inni, 2013). Wykorzystano również mutantu *rh11.c* (linii siostrzanej mutantu *rh11.b*). Ponadto, test komplementacji oparty o analizę pokolenia F₁ oraz około 200 roślin F₂ z krzyżówki obu mutantów wykazał, że geny *rh11* oraz *brb* są alleliczne (Chmielewska i inni, 2014). Prowadzone w Katedrze badania wykazały także, że gen *rh11* zlokalizowany jest w krótkim ramieniu chromosomu 7H (Janiak i Szarejko, 2007). Materiał do szczegółowego mapowania genu *rh11* stanowiła populacja mapująca licząca 4952 osobników pokolenia F₂, wyprowadzona z krzyżowania jęczmienia odmiany ‘Morex’ oraz mutantu *rh11.b*. Północno-amerykańska odmiana ‘Morex’, wykorzystana jako forma rodzicielska tej krzyżówki, jest odmianą browarną, charakteryzuje się 6-rzędowym kłosem, długim źdźbłem oraz dużym rozkrzewieniem. Odmiana ‘Morex’ jest powszechnie stosowana jako forma rodzicielska do tworzenia populacji mapujących jęczmienia. Ponadto, genomowe biblioteki BAC skonstruowane dla odmiany ‘Morex’ zostały wykorzystane podczas badań nad sekwencjonowaniem genomu jęczmienia, w ten sposób genom tej odmiany, zdeponowany w bazie Ensembl Plants (pierwsza wersja genomu: nr akcesyjny: 082214v1 oraz druga wersja: Hv_IBSC_PGSB_v2) stanowi referencyjne źródło dla szerokiego zakresu badań genetycznych.

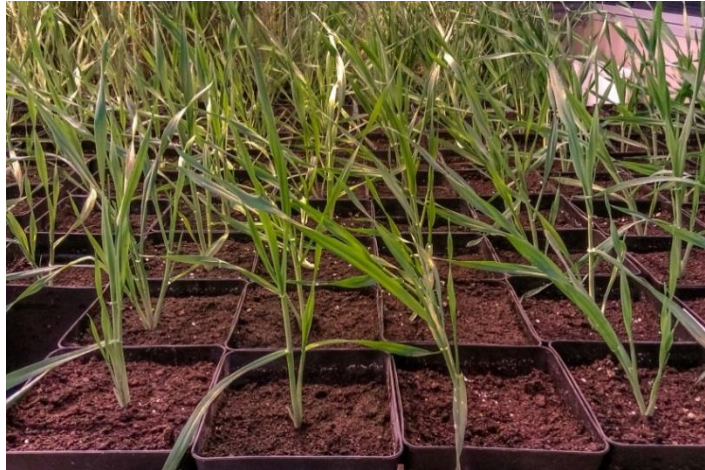


Rycina 3.1. Strefa włosnikowa odmiany ‘Karat’ (A, B, C) i mutantu *rh11* (D, E, F). Zdjęcia wykonane za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (B, C, E, F) oraz mikroskopu świetlnego (A, D). (B, C, E, F, Chmielewska i inni, 2014; zmodyfikowano).

3.2. Warunki wzrostu i fenotypowanie

W celu przeprowadzenia fenotypowania populacji mapującej ziarniaki pokolenia F_2 *rh11.b* x ‘Morex’ oraz form rodzicielskich były poddawane sterylizacji przez 15 min. w plastikowych strzykawkach wypełnionych 1% roztworem podchlorynu sodu. Następnie materiał płukano trzy razy sterylną wodą przez około 5 min. Ziarniaki przenoszono na sterylne szalki Petriego o średnicy 10 cm wypełnione podłożem agarowym, które zostało przygotowane poprzez wylanie 30 ml jałowego 1% roztworu agaru bakteriologicznego (EMAPOL). Na pojedynczą szalkę wysiewano 5 ziarniaków, poprzez wbicie ich w podłoże częścią nie zawierającą zarodka. Szalki uszczelniano parafilmem, owijano aluminiową folią aby zapobiec dostępowi światła, układano pod kątem około 45° i umieszczano w temperaturze 4°C , na okres 24 godzin celem synchronizacji czasu kiełkowania. Następnie, szalki umieszczano w pokoju hodowlanym w temperaturze 18°C , na 98 h. Po tym okresie przeprowadzano analizę fenotypu strefy włosnikowej skielkowanych ziarniaków. Fenotypy zostały sklasyfikowane w dwie kategorie: całkowicie bezwłosnikowy oraz z normalnymi włosnikami (typu dzikiego) i klasom tym przypisano litery „a” bądź „c”, odpowiednio. Dodatkowo, każdej z siewek nadano numer, identyfikujący osobnika F_2 w populacji mapującej. Następnie, skielkowane ziarniaki przenoszono do doniczek z ziemią wymieszaną z wermikulitem i umieszczano w pokoju hodowlanym o fotoperiodzie 16/8 h, w temperaturze 18/18°C (dzień/noc), przy natężeniu światła $180 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Po osiągnięciu stadium trzeciego liścia pobierano materiał do izolacji DNA, a rośliny umieszczano na czas około 14 dni w pokoju hodowlanym o warunkach 4°C , celem pobudzenia rozkrzewienia. Po tym czasie rośliny F_2 o fenotypie

mutanta przenoszono do szklarni i prowadzono w fotoperiodzie 16/8 h, w temperaturze 20/17°C (dzień/noc) i przy natężeniu światła $420 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ do osiągnięcia dojrzałości (Ryc. 3.2).



Rycina 3.2. Rośliny z populacji mapującej krzyżówki *rhl1.b* x ‘Morex’ w warunkach szklarniowych.

W celu izolacji RNA z korzeni mutantów *rhl1.b* i *brb* oraz z ich odpowiednich odmian wyjściowych: ‘Karat’ i ‘Pallas’ przeprowadzono procedurę sterylizacji ziarniaków w taki sam sposób jak opisano powyżej. Następnie ziarniaki przenoszono na zatyczkę z waty, która została wcześniej namoczona w sterylnej wodzie i umieszczona w górnej części sterylnej szklanej probówki (Ryc. 3.3). Ziarniaki układano zarodkiem skierowanym w dół, w liczbie dwa ziarna na probówkę. Dwie szklane probówki uszczelniono razem parafilmem, aby utworzyć zamknięty pojemnik do wzrostu aeroponicznego. Dolną część rur szczelnie zakrywano folią aluminiową, aby chronić ją przed dostępem światła. Szklane probówki umieszczano w pokoju hodowlanym o fotoperiodzie 16/8 h, przy natężeniu światła $180 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ i temperaturze 18/18°C (dzień/noc) na 6 dni. Po tym okresie pobierano materiał do izolacji RNA z trzech różnych stref korzeni: (1) strefy wierzchołkowej, (2) strefy elongacyjnej ze strefą różnicowania razem i (3) strefy włóśnikowej.

A



B



Rycina 3.3. Przygotowanie systemu areopnicznego. (A) Sterylizacja ziarniaków w plastikowych strzykawkach wypełnionych 1% roztworem podchlorynu sodu. (B) Ziarniaki osadzone na zatyckce z waty w szklanych rurkach.

3.3. Analiza rozszczeień fenotypowych w pokoleniu F₂

Przeprowadzano statystyczną analizę rozkładu fenotypu strefy włóśnikowej za pomocą testu $\chi^2_{3:1}$, celem weryfikacji prawidłowości segregacji fenotypu. Wartość testu obliczano zgodnie ze wzorem:

$$\chi^2 = \sum_n \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e}$$

gdzie, n - liczba klas fenotypowych, f_o - liczba osobników obserwowanych w danej

klasie, f_e - oczekiwana liczba osobników w danej klasie.

Hipoteza mówiąca o prawidłowym rozszczeieniu cechy (3:1) była przyjmowana, gdy wartość testu była niższa niż wartość krytyczna $\chi^2_{0,05}$ wynosząca 3,841 dla $df = 1$ i $\alpha = 0,05$.

3.4. Strategia poszukiwania nowych markerów do mapowania

Punktem wyjścia do szczegółowego mapowania locus *rh11* było jego znane położenie w krótkim ramieniu chromosomu 7H, między dwoma markerami SSR, które flankowały gen w odległości 1,7 cM i 4,6 cM (Janiak i Szarejko, 2007; Chmielewska i inni, 2014). Położenie to ustalono w oparciu o mapę skonstruowaną na podstawie analizy 200 osobników populacji mapującej F₂ *rh11.b* x 'Morex'.

Celem prowadzonych badań było skonstruowanie nowej, zagęszczonej mapy sprzężeń, która pozwoliłaby na typowanie genów kandydackich dla identyfikacji genu odpowiedzialnego za bezwłosnikowy fenotyp mutantu. Całe postępowanie obejmowało szereg etapów przedstawionych na Ryc. 3.4. W pierwszym kroku, na podstawie wcześniej opracowanej mapy (Chmielewska i inni, 2014) wybrano trzy loci SSR: *scssr07970* i *EBmatc0016*, flankujące badany gen oraz *GBM1464*, położony w bliskiej odległości od markera *scssr07970*, wynoszącej zaledwie 0,03 cM. Markerów tych użyto je jako punktów wyjściowych do analizy sprzężeń w rozszerzonej populacji mapującej, obejmującej 4952 osobników F₂. Na podstawie analizy segregacji wybranych markerów SSR, wytypowano rekombinanty pomiędzy nimi a badanym genem. Rekombinanty te stanowiły materiał w kolejnym etapie analiz tzn. w pilotażowym eksperymencie wstępnego badania segregacji nowych markerów. Ponieważ markery SSR zostały zmapowane wyłącznie na mapach genetycznych, a ich fizyczne umiejscowienie w chromosomie było nieznanne, konieczne było znalezienie nowych markerów, które pozwoliłyby zakotwiczyć genetyczną mapę regionu obejmującego gen *rh11* na mapie fizycznej chromosomu 7HS. W tym celu wykorzystano informacje o lokalizacji markerów SNP na opublikowanych mapach sprzężeń dla chromosomu 7HS jęczmienia (Rostoks i inni, 2005; Stein i inni, 2007; Close i inni, 2009; Muñoz-Amatriaín i inni, 2011). W poszukiwaniu markerów SNP z regionu genu *rh11* wykorzystano także mapę *Hordeum-PilotOPA1-7H* dostępną w bazie *GrainGenes* oraz wirtualnie uporządkowaną mapę genetyczną jęczmienia (Genome Zipper, Mayer i inni, 2012). Wspólne markery z wszystkich tych map zostały porównane z zasobem *Genome Zipper*, a następnie ten ostatni zasób został użyty do wybrania sekwencji, dla których przeprowadzono analizę polimorfizmów SNP pomiędzy formami rodzicielskimi populacji mapującej, tj. między mutantem *rh11* i odmianą 'Morex'. Tak wytypowane polimorficzne sekwencje wykorzystano jako nowe markery SNP do przeprowadzenia analizy ich segregacji wśród wcześniej wyselekcjonowanych rekombinantów o fenotypie mutantu. Analiza ta pozwoliła na oszacowanie możliwego

sprzężenia nowych markerów SNP z genem *rh11*. W celu znalezienia markera flankującego locus *rh1* w bliższej lokalizacji w porównaniu do wcześniej zmapowanego markera SSR (EBmac0016) od strony proksymalnej chromosomu prowadzono analizę segregacji nowo wytypowanych markerów SNP w mikro-populacji obejmującej 169 osobników F_2 krzyżówki *rh11.b* x 'Morex'. Osobniki te wybrano losowo z dwóch klas fenotypowych całej populacji mapującej (liczącej 4952 osobników) tak, aby stosunek roślin o fenotypie odmiany 'Morex' do osobników wykazujących recesywny fenotyp wynosił 3:1. Nowo zmapowane markery SNP, o znanej fizycznej lokalizacji, posłużyły jako zakotwiczenie genetycznej mapy regionu genu *rh11* na mapie fizycznej genomu jęczmienia.

Kolejnym etapem było zagęszczenia mapy regionu genu *rh11* przy pomocy dodatkowych markerów SNP, opracowanych przy użyciu informacji pochodzących z bazy Ensembl Plants, która zawiera informację o złożonej sekwencji genomu jęczmienia odmiany 'Morex', w wersji 082214v1 (<http://plants.ensembl.org>). Sukcesywnie wybierano sekwencje z bazy Ensembl Plants i sprawdzano, czy są polimorficzne dla osobników rodzicielskich populacji mapującej. Analizy segregacji dla wybranych polimorficznych markerów prowadzono w subpopulacji 1472 osobników F_2 , która składała się 1079 roślin o fenotypie dziki oraz 393 roślin bezwłosnikowych. Subpopulacja ta została wyłoniona losowo z pierwotnej populacji mapującej 4952 osobników F_2 , z zachowaniem stosunku rozszczepienie 3:1 cechy fenotypowej (włosniki do braku włosników). Za każdym razem, po włączeniu do mapy nowego markera SNP, definiowano kierunek poszukiwania kolejnych polimorficznych loci wzdłuż fizycznej mapy chromosomu 7HS jęczmienia.



Rycina 3.4. Schemat postępowania w celu wytypowania genów kandydackich w procedurze mapowania pozycyjnego genu *rh11*.

3.5. Izolacja genomowego DNA

DNA izolowano z liści 5-tygodniowych roślin, stosując metodę micro C-TAB (hexadecylTrimethylAmmonium Bromide; Doyle i Doyle, 1987), zmodyfikowaną w Katedrze Genetyki, UŚ. Zebraną tkankę tzn. 0,2 g świeżych liści umieszczono w woreczkach strunowych wypełnionych żelem krzemionkowym (Sigma-Aldrich) i poddawano suszeniu. W celu utarcia tkanki przygotowywano probówki eppendorf o pojemności 2,2 ml, umieszczano w nich 5 szklanych kulek oraz wysuszoną tkankę a probówki umieszczano w młynie elektrycznym (MP BIOMEDICALS). Mielenie przeprowadzano w urządzeniu FastPrep®-24 przy szybkości 4,0-6,5 m/s przez 2 min., aby otrzymać homogenny proszek. Następnie, w łaźni wodnej podgrzewano do temperatury 60°C bufor ekstrakcyjny C-TAB (Aneks, Tab. 10.1), który wykorzystywano w procedurze izolacji DNA według protokołu Doyle i Doyle (1987). DNA rozpuszczano w 100 ml

buforu TE (Aneks, Tab. 10.2), w temperaturze 4°C przez noc. Po tym czasie dodawano 1 µl RNAzy (10 mg/ml; Aneks, Tab. 10.3) i inkubowano w temperaturze 37°C przez 35 min. Otrzymane roztwory DNA przechowywano w temperaturze -20°C. Stężenie i czystość uzyskanego DNA określono za pomocą spektrofotometru ND-1000 (NanoDrop). Absorbancję mierzono przy długości fali 260 nm. Na podstawie uzyskanego wyniku oznaczano stężenie kwasów nukleinowych w próbach, wyrażone w ng/µl. W oparciu o stosunek absorbancji fal o długościach 260/280 nm określano czystość wyizolowanych kwasów nukleinowych. Aby uznać preparat DNA bądź RNA jako próbę odpowiedniej jakości wartość tego współczynnika musi mieścić się w granicy 1,8-2,0. Kwasy nukleinowe rozcieńczono w ddH₂O.

3.6. Amplifikacja loci SSR i wizualizacja produktów amplifikacji

Rekcję amplifikacji poszczególnych loci SSR prowadzono używając odpowiednich par starterów (Aneks, Tab. 10.9), przy czym jeden starter z pary został wyznakowany fluorescencyjnie znacznikiem IRD800, co umożliwiło wizualizację produktów reakcji podczas elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Mieszaninę reakcyjną do amplifikacji loci SSR przygotowano w następujący sposób:

ddH ₂ O	6,65 µl
10 x PCR bufor	1,0 µl
dNTPs (50 ng/µl, Sigma-Aldrich)	0,4 µl
starter forward (50 ng/µl, Sigma-Aldrich)	0,3 µl
starter reverse (50 ng/µl, Sigma-Aldrich) znakowany IRD800	0,3 µl
DyNAzyme II DNA Polimeraza (2 U/µl, Finnzymes)	0,1 µl
całkowita objętość	8,75 µl

Przygotowaną mieszaninę wprowadzano do próbek PCR, a następnie do każdej dodawano 1,25 µl badanego DNA o koncentracji 50 ng/µl. Reakcje amplifikacji przeprowadzono w termocyklerze firmy Biometra. Programy do amplifikacji dla poszczególnych loci zamieszczono w aneksie (Tab. 10.9).

Wizualizację produktów reakcji amplifikacji prowadzono w 6% denaturujących żelach poliakrylamidowych o grubości 0,2 mm z użyciem systemu do analizy kwasów nukleinowych Li-COR 4300. W tym celu pierwszym etapem było przygotowanie 20 ml

6% żelu poliakrylamidowego (Aneks, Tab. 10.9). Polimeryzację żelu prowadzono z wykorzystaniem odczynnika TEMED, jako katalizatora polimeryzacji oraz 10% roztworu APS jako źródła wolnych rodników. Roztwór żelu poliakrylamidowego wylewano ciągłym strumieniem pomiędzy wcześniej przygotowane i skręcone szyby, następnie wyznaczano czoło żelu. Żel pozostawiano w pozycji horyzontalnej na 50 min. na czas polimeryzacji. Następnie szyby instalowano w aparacie Li-COR między zbiornikami górnym i dolnym, do których wprowadzano bufor elektrodowy (0,5x TBE) (Aneks, Tab. 10.5). Przeprowadzano 15-minutową wstępną elektroforezę, przy następujących parametrach: 1200 V, 30 mA oraz 30 W, celem wyrównania warunków na całej powierzchni żelu oraz aby zogniskować ostrość lasera, co jest niezbędne do określenia płaszczyzny, na której są odczytywane sygnały fluorescencji. W celu przygotowania próbek do elektroforezy, do każdej z prób po amplifikacji dodawano po 4 µl buforu do ładowania z formamidem (Aneks, Tab. 10.6), próby poddawano denaturacji przez 3 min. w temperaturze 95°C, używając termocyklera TGradient (Biometra). Przygotowane w ten sposób próbki oraz marker 350 pz (Li-COR), który służył jako standard wielkości dla produktów, nakładano do żelu w objętości 0,8 µl. Przeprowadzano elektroforezę trwającą 2-3 h, zależnie od badanego locus i stosowano identyczne warunki, jak podczas wstępnej elektroforezy przy średniej prędkości skanowania lasera. Obrazy żeli w formacie pliku TIFF (Tagged Image File Format), generowano za pomocą aplikacji e-Seq i poddawano analizie w programie Adobe Photoshop® CS4. W przypadku locus EBmac0016, na jeden żel nakładano dwukrotnie próby pochodzące z amplifikacji DNA różnych osobników, z zachowaniem odpowiedniego czasowego odstępu. W tym celu zatrzymywano elektroforezę i płukano kieszonki żelu buforem elektrodowym 0,5x TBE przed nałożeniem próbek (Aneks, Tab. 10.5). Takie postępowanie pozwalało na obniżenie kosztów i przyspieszenie procedury genotypowania.

3.7. Projektowanie starterów dla nowych markerów molekularnych i genów kandydackich

Startery do amplifikacji PCR wszystkich markerów i sekwencji genów kandydujących zaprojektowano przy użyciu oprogramowania online Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Untergasser i inni, 2007), (Aneks, Tab. 10.10; Tab. 10.18). Parametry projektowania starterów ustalono tak, aby długość amplifikowanych fragmentów nie przekraczała 1200 pz, przy czym preferowane były dłuższe sekwencje ok. 500-900 pz, co pozwalało zachować wysoką wydajności detekcji polimorfizmów.

Zawartość par GC w starterach stanowiła ok. 50-60%, a ich długość wynosiła od 18 do 24 nukleotydów. Temperatura topnienia (T_m) projektowanych starterów wynosiła od 52 do 64°C, przy czym dopuszczano różnicę maksymalnie 1°C pomiędzy starterem „forward” i „reverse”. W przypadku genów kandydackich startery projektowano w taki sposób, aby fragmenty uzyskane po amplifikacji obejmowały pełną długość genów, zarówno ekson jak i introny, oraz fragmenty sekwencji upstream i downstream, ponadto startery lokalizowano tak, aby końce uzyskanych amplikonów zachodziły na siebie. Sekwencje nukleotydowe starterów porównywano do sekwencji genomu jęczmienia za pomocą algorytmu BLAST w celu sprawdzenia ich specyficzności.

3.8. Optymalizacja warunków reakcji PCR i wizualizacja produktów reakcji

Dla każdej pary starterów przeprowadzono reakcje amplifikacji w gradiencie temperatury, celem doboru jej wartości pozwalającej na uzyskanie specyficznego produktu. Reakcję optymalizacji wykonywano w termocyklerze T-Gradient firmy Biometra, stosując zakres temperatur od 52 do 64°C. Optymalizacja reakcji PCR obejmowała również zmiany koncentracji starterów, matrycy DNA, odczynnika BSA (Bovine Serum Albumin) i liczby cykli. Skuteczność i specyficzność reakcji weryfikowano prowadząc elektroforezę w 1% żelu agarozowym, przez 40 min., przy stałym napięciu 120 V, stosując odpowiedni dla długości danego produktu marker wielkości (100 pz lub 1 kb; Fermentas Waltham, USA) oraz barwnik pozwalający wyznakować DNA w żelu pod światłem UV (bromek etydyny; 10 mg/ml, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA lub Simply Safe, EURx, Gdańsk, Polska). Ostateczny skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowy reakcji PCR wytypowano tak, aby uzyskać specyficzny produkt, w ilości umożliwiającej sekwencjonowanie (Aneks, Tab. 10.10 – Tab. 10.15; Tab. 10.19).

3.9. Analiza wyników sekwencjonowania

Sekwencjonowanie przeprowadzono dla dwóch kategorii fragmentów: dla sekwencji nowych markerów molekularnych, służących do szczegółowego mapowania genu *rh11* oraz dla genów kandydackich, wytypowanych z odpowiedniego interwału na mapie fizycznej jęczmienia. W pierwszym przypadku, za pomocą sekwencjonowania poszukiwano zmian pojedynczych nukleotydów (SNP) oraz krótkich insercji/delekcji (In/Del) między osobnikami rodzicielskimi populacji mapującej, *rh11.b* x ‘Morex’. W drugim przypadku, poszukiwano różnic w pełnych sekwencjach genów między

mutantami bezwłośnikowymi a ich odmianami wyjściowymi, odpowiednio mutantem *rhl1.b* i odmianą ‘Karat’ oraz mutantem *brb* i odmianą ‘Pallas’. Dodatkowo, wybrane fragmenty genów kandydackich sekwencjonowano także dla odmiany ‘Morex’, w celu identyfikacji polimorfizmów, przydatnych do późniejszego genotypowania wybranych rekombinantów. Sekwencjonowanie produktów reakcji PCR wykonywano w komercyjnym laboratorium (Genomed, Warszawa). Uzyskane sekwencje fragmentów DNA (w postaci plików tekstowych i chromatogramów) porównano używając programu CodonCode Aligner 3.7.1 (CodonCode Corporation, Centerville, USA). Aplikacja umożliwiła porównanie wyselekcjonowanych sekwencji, wskazanie różnic pomiędzy nimi, oraz oznaczenie ich lokalizacji i typu zmiany. Otrzymane sekwencje porównano z sekwencjami pobranymi z odpowiednich baz danych, używając aplikacji ClustalW (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>, Cambridge, UK), celem weryfikacji uzyskanych sekwencji. Aplikacja ClustalW pozwoliła na szybkie wielokrotne dopasowanie sekwencji nukleotydowych oraz zapisanie uzyskanych wyników w formacie FASTA.

3.10. Zastosowane metody genotypowania

Do opracowania nowych markerów wykonano analizę polimorfizmów SNP oraz InDel dla wybranych sekwencji DNA pomiędzy mutantem *rhl1.b* i odmianą ‘Morex’, tj. formami rodzicielskimi populacji mapującej. W tym celu, na podstawie informacji o sekwencjach dla potencjalnych markerów projektowano startery do amplifikacji PCR. Dla każdej pary starterów przeprowadzano optymalizację celem uzyskania specyficznego produktu w ilości pozwalającej na sekwencjonowanie. Uzyskane sekwencje fragmentów DNA osobników rodzicielskich populacji mapującej (w postaci plików tekstowych i chromatogramów) poddawano analizie bioinformatycznej celem weryfikacji specyficzności produktu oraz identyfikacji polimorfizmów. Zastosowano różne procedury genotypowania w zależności od rodzaju wykrytego polimorfizmu tzn: bezpośrednią elektroforezę w żelu agarozowym, metodę CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), HRM (High Resolution Melting) oraz EcoTILLING (Aneks, Tab. 10.10).

3.10.1. InDel

W przypadku markerów InDel, 5 µl produktu PCR analizowano przez elektroforezę w 2-3% żelu agarozowym w buforze 0,5 TBE (Aneks, Tab. 10.5). Produkty reakcji PCR, które zostały poddane analizie tego typu różniły się długością w zakresie od 5 pz do 198 pz

pomiędzy osobnikami rodzicielskimi populacji mapującej. Jeżeli reakcja PCR była przeprowadzana przy użyciu polimerazy Color Taq (EURX, Gdańsk, Polska) próby bezpośrednio po reakcji były poddawane elektroforezie, gdyż mieszanina dostarczana przez producenta posiada w swoim składzie bufor obciążający. W przypadku korzystania z polimerazy DyNAzyme II (Finnzymes, Waltham, USA), przed rozdzieleniem w żelu do każdej próby dodawano bufor obciążający z sacharozą (2 µl/10 µl próbki; Aneks, Tab. 10.7). Czas elektroforezy oraz stosowane napięcie skorygowano pod względem długości każdego produktu, tak aby wyraźnie rozróżnić allele rodzicielskie.

3.10.2. CAPS

Po zidentyfikowaniu polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) pomiędzy rodzicielskimi genotypami populacji mapującej, uzyskane sekwencje analizowano za pomocą programu NEBcutter V2.0 (Vincze i inni 2003; New England Biolabs; <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>), aby sprawdzić, czy możliwe jest przekształcenie polimorfizmu w marker CAPS. Analiza, umożliwiła wytypowanie odpowiednich enzymów restrykcyjnych. Do dalszych badań wybierano enzymy, które spełniały następujące założenia: długości produktów uzyskanych po reakcji cięcia musiały pozwolić na wyraźne rozróżnienie alleli rodzicielskich; obecność maksymalnie trzech miejsc cięcia w analizowanej sekwencji oraz stosunkowo niska cena enzymu. Skład mieszaniny restrykcyjnej oraz warunki cięcia były optymalizowane dla poszczególnych enzymów (Aneks, Tab. 10.10). Sprawdzano proporcje ilości restryktazy i produktu reakcji PCR oraz czas traktowania enzymem. Reakcję restrykcji prowadzono w łaźni wodnej w temperaturze optymalnej dla każdego z użytych enzymów. Czas inkubacji wynosił 3 lub 16 godzin w zależności od stosowanej restryktazy. Po zakończonej reakcji, do produktów cięcia wprowadzano bufor obciążający z sacharozą (2 µl/10 µl próbki; Aneks, Tab. 10.7) i prowadzono elektroforezę w 2% żelu agarozowym przy stałym napięciu 120 V, dobierając czas w taki sposób, aby wystarczająco rozdzielić produkty cięcia restryktazami.

3.10.3. High Resolution Melting

Jeden marker SNP (3_0752), który nie mógł być przekształcony w marker CAPS analizowano za pomocą metody HRM. Amplifikację wybranej sekwencji za pomocą PCR w obecności fluorescencyjnych barwników, tworzenie homo- i heterodupleksów oraz

monitorowanie zmian fluorescencji przeprowadzano stosując urządzenie Light Cycler® 480 II (Roche Diagnostics, Niemcy). W pierwszym etapie podczas namnażania DNA, molekuly barwnika LCgreen Plus+, interkalują pomiędzy pary zasad dsDNA. Po reakcji PCR następuje krótka denaturacja, a następnie szybkie ponowne łączenie ampliconów w celu generowania dupleksów. W przypadku próbek homozygotycznych obecne są tylko fragmenty homodupleksowego DNA, podczas gdy dla próbek heterozygotycznych lub puli zawierających polimorfizm (w stanie homo- lub heterozygotycznym), tworzone są cztery dupleksy DNA - dwa homodupleksy i dwa heterodupleksy. W kolejnym etapie, w wyniku denaturacji dsDNA następuje uwalnianie barwników, skutkujące zmniejszeniem fluorescencji, co monitorowane jest za pomocą przyrządu HRM w czasie rzeczywistym. W ten sposób cały proces można zaobserwować jako charakterystyczny profil topnienia. Zmiana w sekwencji DNA, jest wykrywalna z powodu tworzenia heterodupleksu, dla którego obserwuje się zmieniony profil topnienia. Ponieważ heterodupleksy są mniej stabilne niż homodupleksy, utratę fluorescencji obserwuje się w niższych temperaturach niż w przypadku homodupleksów. Różnice między homozygotycznymi próbkami można zaobserwować jako przesunięcie temperatury topnienia, podczas gdy zmiany w kształcie krzywych topnienia wykazują różne heterozygotyczne próbki.

W prezentowanej pracy zastosowano tworzenie puli próbek co istotnie ułatwia wykrywanie polimorfizmów w układzie homozygotycznym. Zastosowanie pulowania prób pozwala wyeliminować błędy, które mogłyby być spowodowane niedostateczną czułością sprzętu bądź błędną analizą bioinformatyczną. W tym celu dla każdego osobnika przygotowano dwa rodzaje próbek DNA. Pierwsza próbka reprezentowała jedynie testowany DNA otrzymany z każdego osobnika populacji F_2 , ten rodzaj prób pozwolił na identyfikację heterozygotycznego osobnika. Druga próbka składała się z mieszaniny dwóch genotypów, tzn. z DNA pochodzącego od testowanego osobnika F_2 i referencyjnego DNA pochodzącego z odmiany 'Morex'. Ta próbka pozwoliła na identyfikację osobników F_2 z polimorfizmem SNP w stanie homozygotycznym, dzięki tworzeniu niedopasowania między DNA tego osobnika i DNA odmiany 'Morex'. Reakcję przygotowano w objętości 20 μ l za pomocą gotowego zestawu odczynników High Resolution Melting Master Kit wersja 06 (Roche Diagnostics, Niemcy) zgodnie z protokołem producenta, tzn. mieszając 0,2 μ M każdego startera, 0,75 mM $MgCl_2$ i 20 ng matrycowego DNA. Reakcję przeprowadzono przy użyciu przyrządu LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Niemcy) stosując następujące warunki: etap wstępnej denaturacji w 95°C przez 10 minut, 42 cykli etapu amplifikacji (denaturacja w 95°C przez 10 sek.,

przyłączanie starterów w 56°C przez 15 sek. i elongacja w 72°C przez 20 sek. z pojedynczym pomiarem fluorescencji). Następnie denaturacja dsDNA w 95°C przez 1 min. i tworzenie dupleksów przez ochładzanie do 40°C przez 1 min. Interwał topnienia, w którym następuje wzrost temperatury i uwalnianie barwnika obejmował przedział temperaturowy 65°C - 95°C, z ciągłym gromadzeniem fluorescencji.

Analizę danych przeprowadzono przy użyciu oprogramowania LightCycler® 480 Gene Scanning Software w wersji 1.5.0 SP4 (Roche Diagnostics, Niemcy).

3.10.4. EcoTILLING

Metoda EcoTILLING (Comai i inni, 2004) została wykorzystana do analizy segregacji mutacji zidentyfikowanej w kandydackim genie HORVU7Hr1G030250 (MLOC_38567). Przed reakcją PCR przygotowano dwie próbki DNA dla każdego osobnika F₂, w taki sam sposób, jak w przypadku procedury HRM opisanej powyżej. Badanie EcoTILLING obu próbek pozwoliło ustalić, czy konkretna roślina F₂ jest homo- lub heterozygotyczna pod względem analizowanego SNP, na podstawie analizy produktów amplifikacji badanego fragmentu poddanego cięciu endonukleazą CEL I. Endonuleaza ta rozpoznaje miejsce niedopasowania w DNA, tnąc obie nici po stronie 3' od niego. Obie próby DNA wspólnie procesowano poprzez przeprowadzenie reakcji PCR z użyciem specyficznych starterów znakowanych i nieznakowanych, tworzenie heterodupleksów, cięcie enzymem, oczyszczanie produktu oraz elektroforezę i wizualizację produktów w żelu poliakrylamidowym. Mieszanina reakcyjna PCR w objętości 20 µl zawierała 100 ng matrycowego DNA, 1 x bufor PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8,0 w 22°C, 1,5 mM MgCl₂, 100 mM KCl i 50% glicerol), 250 mM każdego z dNTP i 1U polimerazy TaqDNA (Color Taq DNA Polymerase, EURx, Polska) i 10 pmol mieszaniny starterów. Mieszanina ta składała się ze specyficznych starterów nieznakowanych oraz znakowanych różnymi fluoroformami (forward: IR700 i reverse: IR800). Stosunek znakowanych do nieznakowanych starterów wynosił 3:2 dla starterów forward i 4:1 dla starterów reverse. Profil reakcji PCR składał się z początkowej denaturacji przez 5 min. w 94°C, 33 cykli denaturacji przez 45 sek. w 94°C, hybrydyzacji starterów przez 45 sek. w 58°C, wydłużenia przez 1 min. w 72°C, a następnie końcowego wydłużania w 72°C przez 5 min. Po reakcji PCR produkty poddano formowaniu heterodupleksów poprzez denaturację i ponowną renaturację nici na skutek podgrzania prób do temperatury 94°C i powolnego ich ochładzania przy użyciu termocyklera. Następnie, produkty te przenoszono do nowej

próbówki i cięto przy pomocy enonukleazy CEL I, wykorzystując w tym celu enzym obecny w ekstrakcie z selera naciowego (Celery Juice Extract, CJE). Do 10 µl każdej próby dodawano po 20 µl roztworu 0,1x CJE (Aneks, Tab. 10.8). Próby inkubowano w termocyklerze w temperaturze 45°C przez 15 min. Mieszanina homo- i heterodupleksów tworzy substrat dla enzymu CEL I, który po rozpoznaniu struktury heterodupleksowej nacina obie nici po stronie 3' niedopasowania. Następnie prowadzono oczyszczanie produktu, w tym celu do każdej próby wprowadzano 60 µl 95% alkoholu etylowego z octanem sodu (1% udział objętościowy), co powodowało wytrącenie DNA oraz denaturację enzymów, a tym samym zatrzymanie reakcji. Do oczyszczonych próbek dodawano po 4 µl buforu obciążającego (Aneks, Tab. 10.6) i poddawano denaturacji przez 3 min. w temperaturze 95°C używając termocyklera TGradient (Biometra). Elektroforezę i wizualizację produktów reakcji amplifikacji prowadzono w 6% denaturujących żelach poliakrylamidowych i przy użyciu automatycznego sekwenatora Li-COR. Żel oraz szyby przygotowano w taki sam sposób jak w przypadku procedury do wizualizacji markerów SSR. Jako standard wielkości produktów użyto mieszaninę markerów (IRDye®700 dla kanału 700 nm oraz IRDye®800 dla kanału 800 nm), co umożliwiło określenie długości produktów mieszczących się w zakresie 50-700 pz. Czas elektroforezy wynosił 3,5 h przy 1500 V, 30 mA oraz 30 W. Analizy obrazów żeli prowadzono w programie Adobe Photoshop® CS4. Analiza sygnałów w żelach poliakrylamidowych opierała się na rozpoznawaniu prążków, które reprezentowały produkty o niepełnej długości, przy czym suma długości fragmentów w kanale IR700 i IR800 powinna być identyczna jak całkowita długość badanego fragmentu genu. Rośliny posiadające polimorfizm w stanie homozygotycznym tworzyły sygnał jedynie w próbach, w których ich DNA łączono z DNA kontroli, gdyż w miejscu polimorfizmu sekwencja rośliny F₂ była odmienna od sekwencji kontroli, co jest warunkiem koniecznym do utworzenia heterodupleksu, a tym samym cięcia przez enzym CEL I. W próbach zawierających jedynie DNA rośliny F₂ z populacji mapującej, która posiada polimorfizm w stanie homozygotycznym, nie dochodzi do generowania heterodupleksu, gdyż allele z chromosomów homologicznych są identyczne. Z kolei w przypadku osobników F₂, które posiadają polimorfizm w stanie heterozygotycznym, obserwuje się sygnał zarówno w próbach powstałych z połączenia z DNA kontroli, jak i w próbach zawierających tylko DNA badanego osobnika, ponieważ heterodupleksy mogą również powstawać między dwoma allelami zlokalizowanymi w chromosomach homologicznych u heterozygoty.

3.11. Analiza sprzężeń markerów i konstruowanie mapy genetycznej

Analizę sprzężeń wykonano przy użyciu programu JoinMap 3.0 (Van Ooijen and Voorrips, 2001). Genotypy osobników F₂ z populacji mapującej zakodowano jako „a” w przypadku homozygoty niosącej allel SNP mutanta *rh11.b*, „b” w przypadku homozygoty niosącej allel odmiany ‘Morex’ i „h” dla heterozygoty. Fenotyp strefy włóśnikowej korzeni oznaczono jako cechę dominującą i zakodowano jako „a”, w przypadku bezwłóśnikowych osobników F₂, identycznych jak mutant *rh11.b* oraz „c” w przypadku roślin F₂ z prawidłowo rozwiniętymi włóśnikami. Brak danych o genotypie oznaczono jako „-”. Przygotowane dane wprowadzono do programu Microsoft Office Excel, a następnie plik zaimportowano do aplikacji JoinMap 3.0. W celu sprawdzenia, czy mapowane loci nie wykazują zaburzeń w segregacji przeprowadzono test zgodności χ^2 . Marker, który wykazywał odchylenie od spodziewanej segregacji wykluczano z analizy. Grupowanie markerów przeprowadzono stosując wartość graniczną współczynnika LOD równą 3,0, co oznacza, iż prawdopodobieństwo sprzężenia między analizowanymi loci jest 1000 razy większe niż prawdopodobieństwo braku sprzężenia. Odległości między markerami obliczono zgodnie z funkcją Kosambi (1944).

3.12. Analiza sekwencji z wytypowanego interwału

Sekwencję oraz dane o chromosomowej lokalizacji wytypowanego interwału, pobrano z zasobów bazy Ensembl Plants (<http://www.ensembl.org>). Na podstawie adnotacji z bazy oznaczono sekwencje o strukturze funkcjonalnych genów. Ponadto, sekwencję wytypowanego interwału porównano z zastosowaniem algorytmu BLAST do wyników sekwencjonowania RNA oraz flcDNA (ang. full length cDNA, HC_genes_CDS oraz LC_genes_CDS), zdeponowanych w bazie Genomic Standards Consortium (<http://gensc.org/projects/mips/>), co pozwoliło wskazać ewentualne sekwencje, które również mogłyby posiadać strukturę funkcjonalnych genów. Sekwencja interwału obejmującego gen *rh11* została ponadto poddana charakterystyce *in silico* przy użyciu kilku narzędzi do opisu sekwencji. Analizę powtórzeń i sekwencji DNA o niskiej złożoności przeprowadzono przy użyciu RepeatMasker Open w wersji 4.0 (Smit; <http://www.repeatmasker.org>). Skrypt języka PERL RepeatMasker do poprawnego działania wymaga powiązania z następującymi narzędziami: RMBlast w wersji 2.2.8 (<http://www.repeatmasker.org/RMBlast.html>), TRF (Tandem Repeat Finder) w wersji 4.0.9 (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>), RepBase w wersji 20170127

(<http://www.girinst.org/rebase/>). RMBlast to specjalna wersja oprogramowania NCBI blastN, kompatybilna z programem RepeatMasker. Tandem Repeats Finder to program który umożliwia lokalizację i wydrukowanie powtórzeń tandemowych w sekwencjach DNA. RepBase to baza danych powtórzeń DNA zapisana w formacie obsługiwanym przez program RepeatMasker. RepeatMasker skanuje sekwencje DNA w poszukiwaniu powtórzeń rozproszonych i sekwencji o niskiej złożoności. Porównania sekwencji są dokonywane przez program RMBlast oraz TRF z wykorzystaniem bazy Repbase. Wynikiem analizy są szczegółowe oznaczenia powtórzeń, które są obecne w sekwencji wejściowej (Aneks 2, w pliku Aneks2.docx, Tab. 1).

3.13. Funkcjonalna i strukturalna analiza genów kandydackich

W celu przypisania potencjalnych funkcji do genów kandydackich, przeprowadzono analizę podobieństwa tych sekwencji do genów i białek u innych gatunków, stosując algorytm BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Jako zapytanie (ang. query) do przeszukiwania baz użyto sekwencji kodujących (ang. coding DNA sequence – CDS) genów kandydackich oraz sekwencji białkowych, które zostały pobrane z bazy Ensembl Plants (<http://www.ensembl.org>). Informacje o strukturze genów kandydackich również pobrano z bazy Ensembl Plants.

3.14. Strukturalna analiza genu HORVU7Hr1G030250 oraz identyfikacja konserwatywnych motywów białkowych

W wyniku przeprowadzonych badań zidentyfikowano gen potencjalnie odpowiedzialny za tworzenie wzoru epidermy korzeni i inicjację włóśników, o numerze akcesyjnym HORVU7Hr1G030250 (MLOC_38567). Analizę jego struktury przeprowadzono za pomocą programów Genscan (Burge i Karlin, 1997, <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) oraz programu Fgenesh (Solovyev i inni, 200; www.softberry.com), wykorzystując jako organizmy modelowe odpowiednio kukurydzę i jęczmień. Identyfikację konserwatywnych motywów białkowych przeprowadzono przy użyciu aplikacji InterProScan (Jones i inni, 2014, <http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>) z ustawieniami standardowymi. Strukturalne dopasowanie konserwatywnej sekwencji białka zostało przygotowane za pomocą narzędzia T-coffee (Tree based Consistency Objective Function For AlignmEnt Evaluation, Notredame i inni, 2000; <http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/index.html>) wspieranym przez wizualizację graficzną w oprogramowaniu SeaView w wersji 4.0 (Gouy i inni, 2010;

<http://doua.prabi.fr/software/seaview>). Identyfikację motywu promotorowego L1 przeprowadzono przez wyszukanie fragmentu - "TAAATGT", w sekwencji kandydackiego genu w regionie 3 kpb powyżej kodonu start.

3.15. Przewidywanie potencjalnych skutków mutacji w genie HORVU7Hr1G030250

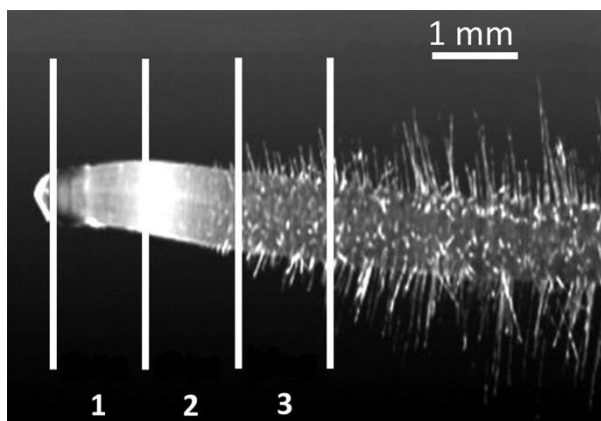
W celu przewidywania możliwych skutków mutacji w genie HORVU7Hr1G030250 (MLOC_38567) użyto narzędzi NetGen (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) oraz SpliceProt (<http://spliceport.cbcb.umd.edu/>). Aplikacje umożliwiły przedstawienie w tekstowy sposób lokalizacji miejsc splicingowych w sekwencji genu (sekwencji donorowej, akceptorowej, oraz miejsca rozgałęzienia) dla odmiany wyjściowej i mutantu. Celem wykrycia możliwych otwartych ramek odczytu sekwencji transkryptu dla mutantu *rh11.b* oraz jego formy wyjściowej 'Karat' wykorzystano narzędzie do translacji in silico w portalu ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>). Z kolei, w celu porównania sekwencji białkowych homologicznych białek innych gatunków do domniemanego białka syntetyzowanego u mutantu bezwłośnikowego oraz odmiany wyjściowej, użyto edytora SeaView (Gouy i inni, 2010).

3.16. Izolacja RNA

Wszystkie etapy izolacji RNA przeprowadzono w warunkach wolnych od RNaz. RNA izolowano z 6-dniowych korzeni, oddzielnie z fragmentów każdej strefy korzeniowej o długości 1 mm: (1) strefa wierzchołkowa korzenia, (2) strefa elongacji wraz ze strefą różnicowania i (3) strefa włósnikowa (Ryc. 3.5). Postępowano według następującego protokołu:

1. Tkanę ucierano w schłodzonym do temperatury -20°C moździerzu ceramicznym w 1 ml odczynnika TRIzol (Invitrogen GmbH, Niemcy).
2. Próby homogenizowano w Trizolu przez 5 min.
3. Lizat przenoszono do próbek typu eppendorf o pojemności 1,5 ml, a moździerz przemywano 150 µl buforu lizującego, który dodawano do z pierwotnego lizatu.
4. Próby poddawano wirowaniu przez 3 min. w temperaturze 4°C, przy 14 000 g.
5. Uzyskany supernatant przenoszono do nowej próbówki.

Wszystkie następne etapy przeprowadzono przy użyciu zestawu RNAqueous Kit (AMBION, Thermo Scientific, Waltham, USA) postępując zgodnie z instrukcjami producenta, z drobnymi modyfikacjami. Otrzymane roztwory RNA przechowywano w temperaturze -20°C. Stężenie i czystość uzyskanego RNA sprawdzano tak samo jak w przypadku DNA (Metody, 3.5).



Rycina 3.5. Trzy strefy korzenia, z którym pobierano tkankę do izolacji RNA. 1 - strefa wierzchołkowa korzenia, 2 - strefa elongacji ze strefą różnicowania 3 - strefa włosnikowa (Fot. Kwaśniewski, zmodyfikowano).

3.17. Analizy ekspresji genów

Analizę ekspresji przeprowadzono dla genów z tabeli 3.1. Listę użytych starterów zamieszczono w aneksie (Tab. 10.20)

Tabela 3.1. Wybrane geny potencjalnie zaangażowane w inicjację procesu morfogenezy włosników u jęczmienia.

MLOC ID ¹	HORVU ID ²	Prawdopodobny produkt białkowy
MLOC_21703	HORVU7Hr1G081740	endotransglikozylaza ksyloglukanu
MLOC_74876	HORVU4Hr1G062120	RhoGTPase GDP / możliwy ortolog genu <i>SCNI(SUPERCENTIPEDE1)</i>
MLOC_4597	HORVU2Hr1G081920	białko z powtórzeniami diesteroglicerofosforylowymi, podobne do fosfodiesterazy i zawierające kotwicę glikozylfosfatydylolinozytolową / możliwy ortolog genu <i>SHAVEN3 (SHV3)</i> ;
MLOC_60217	HORVU2Hr1G097490	ekspansyna
AGP	HORVU7Hr1G046210	arabinogalaktan
MLOC_75055	HORVU7Hr1G119340	ekspansyna

¹ - Identyfikator MLOC - identyfikator genu zgodnie z wersją genomu jęczmienia 082214v1; ² - Identyfikator HORVU - identyfikator genu według wersji genomu jęczmienia Hv_IBSC_PGSA_v2

Analizę ekspresji genów przeprowadzono przy użyciu trzech powtórzeń biologicznych dla każdego genotypu (*rhl1.b* i *brb* oraz ich odpowiednich odmian wyjściowych 'Karat' i 'Pallas'), przy czym jedno powtórzenie składało się z odpowiednich segmentów korzeni zebranych z pięciu roślin. Dla każdego biologicznego powtórzenia reakcji qPCR przeprowadzono dwa techniczne powtórzenia. RNA wyizolowane z segmentów korzenia poddano działaniu DNazy (Promega, Madison, USA), celem usunięcia pozostałości genomowego DNA. Reakcje przeprowadzono w probówkach typu eppendorf o pojemności 0,2 ml, a mieszanina reakcyjna zawierała 1 µg totalnego RNA, 1 x stężony bufor dla DNazy RQ1 oraz 1U tego enzymu. Całkowita objętość mieszaniny wynosiła 10 µl. Próby inkubowano przez 30 min. w temperaturze 37°C. Następnie, do każdej próby wprowadzono 1 µl buforu STOP (20 mM EGTA) i prowadzono inkubację w temperaturze 65°C przez 10 min. celem zatrzymania reakcji. Tak przygotowane próby stosowano jako matrycę do reakcji odwrotnej transkrypcji. Do syntezy cDNA zastosowano zestaw Maxima (Thermo Scientific, Waltham, USA) przygotowując mieszaninę reakcyjną zgodnie z instrukcjami producenta. Reakcje przeprowadzono przy użyciu termocyklera (Biometra), próby inkubowano przez 10 min. w temperaturze 25°C, następnie schładzano do temperatury 50°C przez 15 min., zatrzymanie reakcji prowadzono przez ogrzewanie prób do temperatury 85°C przez 5 min. Próby cDNA rozcieńczono pięciokrotnie w ddH₂O i przechowywano w temperaturze -20°C.

Do analizy ekspresji zastosowano metodę qPCR wykorzystującą barwnik fluorescencyjny SYBR Green, który ulega interkalacji pomiędzy dwie nici DNA i wzbudzony przy pomocy światła UV umożliwia detekcję kwasów nukleinowych. Reakcję qPCR przeprowadzono przy użyciu zestawu LightCycler® 480 SYBR™ Green I Master i urządzenia LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Niemcy). Mieszanina reakcyjna o całkowitej objętości 10 µl obejmowała: 2 µl rozcieńczonego cDNA, 10 pmol każdego startera do PCR i 5 µl SYBR™ Green I Master Mix. Dla wszystkich badanych genów zastosowano następujące warunki reakcji: wstępną denaturację przez 5 min. w 95°C, 42 cykle denaturacji przez 10 sek. w 95°C, przyłączanie starterów przez 15 sek. w 56°C i elongacji przez 15 sek. w 72°C, z pomiarem fluorescencji, który następował pod koniec każdej rundy amplifikacji. Po zakończeniu cykli reakcji PCR przeprowadzono analizę krzywej topnienia, stosując inkubację w 95°C przez 1 min., 40°C przez 1 min. i przedział topnienia 65 - 95°C z ciągłym odczytem fluorescencji. Analizę wyników reakcji wykonywano przy użyciu oprogramowania LightCycler® 480 Gene Scanning Software w wersji 1.5.0 SP4 (Roche Diagnostics, Niemcy), postępując zgodnie z instrukcją obsługi

oprogramowania. Do analizy wybrano wyłącznie te próby, dla których powstawał tylko jeden produkt amplifikacji o spodziewanej temperaturze topnienia.

Względny poziom ekspresji każdego genu obliczono za pomocą metody $2^{(-\Delta\Delta C_p)}$. Dla każdego z genotypów przeprowadzono normalizowanie wartości C_p (ang. Crossing point – cykl reakcji, w którym nastąpiło przekroczenie poziomu tła oraz wejście w fazę wzrostu wykładniczego) dla badanego genu z danej strefy korzenia względem wartości C_p genu referencyjnego, zgodnie ze wzorem:

$$\Delta C_p = C_p \text{ genu badanego} - C_p \text{ genu referencyjnego.}$$

Jako gen referencyjny zastosowano gen kodujący czynnik ADP1 (ADP-ribosylation factor 1-like protein, AJ508228.2; Rapacz i inni, 2012). Każdą ze stref korzenia określonego genotypu ('Pallas', 'Karat', *brb*, *rhll*), z wyjątkiem strefy apikalnej w odmianie 'Karat', traktowano jako próbę eksperymentalną, dla której obliczono względny poziom ekspresji analizowanych genów. Poziom ten określano względem poziomu ekspresji w strefie apikalnej w odmianie 'Karat', która została uznana za wartość równą 1. W tym celu zastosowano następujący wzór:

$$\Delta\Delta C_p = \Delta C_{p1} - \Delta C_{p2}$$

$$\Delta C_{p1} = \\ C_p \text{ badanego genu w próbie eksperymentalnej} - \\ C_p \text{ genu referencyjnego w próbie eksperymentalnej}$$

$$\Delta C_{p2} = \\ C_p \text{ analizowanego genu w odmianie 'Karat' w strefie apikalnej} \\ - C_p \text{ referencyjnego genu w odmianie 'Karat' w strefie apikalnej}$$

Istotność statystyczną różnic ekspresji genów między próbkami obliczono za pomocą analizy wariancji jednoczynnikowej (ANOVA) i testu LSD ($P \leq 0,05$).

3.18. Konstrukcja drzewa filogenetycznego

Drzewo filogenetyczne rodziny białek bHLH zostało skonstruowane metodą największej wiarygodności przy użyciu narzędzia W-IQ-TREE (Nguyen i inni, 2015; Trifinopoulos i inni, 2016). Sekwencja białka kodowanego przez gen kandydacki HORVU7Hr1G030250 (MLOC_38567) została porównana do kilku innych białek bHLH

u jęczmienia i ryżu o największym podobieństwie do sekwencji genu kandydackiego. Jednocześnie wykorzystano sekwencje aminokwasowe białek Ljrh11 z *Lotus japonicus* (Karas i inni, 2009) i Osrh11 z ryżu (Ding i inni, 2009). Sekwencje białek z rodziny bHLH u *Arabidopsis*, poprzednio opisane przez Heima i innych (2003) i Toledo-Ortiz i innych (2003), zostały użyte jako tło do konstrukcji drzewa filogenetycznego, pozwalające na przyporządkowanie sekwencji genu kandydackiego do określonej podrodziny białek bHLH (Aneks, Tab. 10.21; 10.22; 10.23). Dla wszystkie sekwencji białek przeprowadzono ich dopasowanie przy użyciu programu Clustal Omega (EMBL-EBI: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). Uzyskany plik został następnie użyty jako dane wejściowe dla narzędzia W-IQ-TREE. W celu identyfikacji najbardziej pasującego modelu substytucji zastosowano algorytm ModelFinder (Kalyaanamoorthy i inni, 2017), natomiast aby ocenić wiarygodność grupowania poszczególnych białek wykorzystano testy statystyczne ultrafast bootstrap (Hoang i inni, 2017) oraz aLRT (Guindon i inni, 2010).

4. Wyniki

4.1. Powiększenie populacji mapującej F₂ *rhll.b* x ‘Morex’

Wcześniejsze badania prowadzone w Katedrze Genetyki UŚ z wykorzystaniem 200 roślin F₂ populacji mapującej *rhll.b* x ‘Morex’, pozwoliły na zmapowanie genu *rhll* w chromosomie 7HS, w otoczeniu trzech najbliższych markerów typu SSR. W dalszych pracach rozszerzono populację mapującą do 1679 osobników, które wstępnie scharakteryzowano fenotypowo. W niniejszej pracy wyprowadzono 3273 nowych roślin F₂ i ostatecznie analizowaną populację mapującą F₂ *rhll.b* x ‘Morex’ liczy 4952 osobników. Wśród roślin pokolenia F₂, w wyniku przeprowadzenia analizy rozszczepień fenotypowych dla strefy włóśnikowej korzenia, otrzymano rozszczepienie 3:1, na rośliny wykazujące fenotyp normalny i pozbawione włóśników. Statystyczna analiza rozkładu fenotypowego przeprowadzona za pomocą testu $\chi^2_{3:1}$, wykazała prawidłowość segregacji, gdyż wartość $\chi^2_{3:1}$ była niższa niż wartość krytyczna, która wynosi 3,841 dla $df = 1$ i $\alpha = 0,05$. (Tab. 4.1).

Tabela 4.1. Analiza rozkładu fenotypowego dla 4952 osobników ostatecznie uzyskanej populacji mapującej F₂ *rhll.b* x ‘Morex’.

Fenotyp	Oczekiwane rozszczepienie	Liczebność oczekiwana (e)	Liczebność uzyskana (f)	(e-f) ² /e
Włóśniki normalne	3	3714	3711	0,002423
Bezwłóśnikowy	1	1238	1241	0,00727
Suma			4952	$\chi^2=0,009693$

4.2. Analizy segregacji dla markerów SSR oraz wybór rekombinantów

Na podstawie informacji o pozycji markerów na wcześniej opracowanej mapie genetycznej dla populacji F₂ krzyżówki *rhll.b* x ‘Morex’, wybrano trzy markery typu SSR: GBM1464, scssr07970, EBmac0016. Markery scssr07970 oraz EBmac0016 zmapowane zostały jako punkty flankujące gen *rhll* w odległości odpowiednio 1,7; 4,6 cM. Z kolei marker GBM1464 zlokalizowany został w odległości 1,73 cM w stosunku do locus *rhll*, bardzo blisko markera scssr07970 (Chmielewska i inni, 2014). Przeprowadzono analizę segregacji wytypowanych markerów wśród 1241 osobników wykazujących fenotyp mutanta *rhll.b* (Ryc. 4.1). Ogółem, wśród 1241 osobników pozbawionych włóśników zidentyfikowano 228 rekombinanty pod względem flankujących gen markerow SSR,

w tym 8 podwójnych (Tab. 4.2; Tab. 4.3). Wszystkie 228 roślin posłużyło jako materiał do poszukiwania dodatkowych markerów, które mogły zawęzić interwał obejmujący gen *rh11* i umożliwić zakotwiczenie ich genetycznych pozycji na fizycznej mapie jęczmienia. Żaden z wcześniej zmapowanych markerów nie posiadał znanej fizycznej lokalizacji.

Tabela 4.2. Segregacja markerów SSR wśród 228 rekombinantów F₂ wykazujących fenotyp bezwłosnikowy.

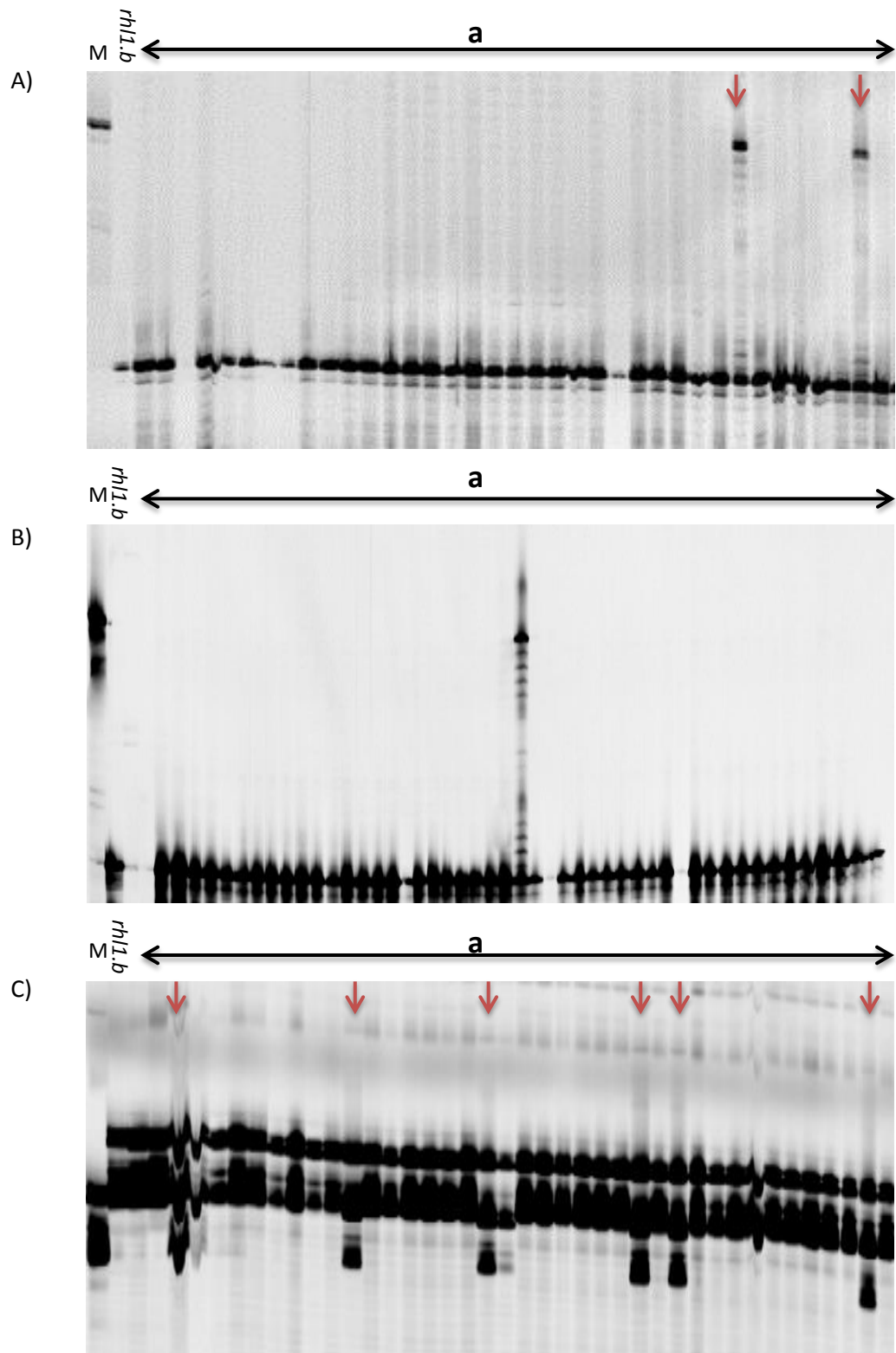
Marker	Klasy genotypowe			
	a	h	b	c
<i>rh11</i>	228	0	0	0
Scssr07970	181	47	0	0
GBM1464	186	42	0	0
EBmac0016	44	179	0	0

a – homozygota z allelami markera SSR jak mutant *rh11.b*; b – homozygota z allelami markera SSR jak odmiana 'Morex'; h – heterozygota; c – genotyp inny niż "a".

Tabela 4.3. Wyniki genotypowania 8 podwójnych rekombinantów F₂ zidentyfikowanych dla rejonu genu *rh11* otoczonego najbliższymi zlokalizowanymi markerami GBM1464, scssr07970, EBmac0016.

Marker	1	2	3	4	5	6	7	8
GBM1464	h	h	h	h	h	h	h	h
scssr07970	h	h	h	h	h	h	h	h
<i>rh11</i>	a	a	a	a	a	a	a	a
EBmac0016	h	h	h	h	h	h	h	h

a – homozygota z allelami markera SSR jak mutant *rh11.b*; h – heterozygota



Ryciana 4.1. Przykładowe zdjęcia żeli poliakrylamidowych przygotowane w ramach analizy markerów a) *scsr07970*, b) *EBmac0016* oraz c) *GBM1464*. M – odmiana rodzicielska ‘Morex’; *rhl1* – bezwłośnikowy mutant; a - rośliny F₂ z krzyżówki *rhl1.b* x ‘Morex’ wykazujące fenotyp bezwłośnikowy. Czerwone strzałki wskazują rekombinanty pomiędzy genem *rhl1*, a analizowanym markerem.

4.3. Wyprowadzanie nowych markerów typu SNP położonych w rejonie genu *rh11*

Analiza informacji literaturowych dotyczących map genetycznych jęczmienia, jak i internetowych baz danych, umożliwiła selekcję informacji z istniejących map genetycznych chromosomu 7HS jęczmienia, w których zmapowane markery stanowią punkty wspólne z mapą obejmującą gen *rh11* (Janiak i Szarejko, 2007; Chmielewska i inni, 2014). Wspólnie zakotwiczonymi loci były dwa markery typu SSR: *scssr07970* i *GBM1464* (Close i inni, 2009; Muñoz-Amatriaín i inni, 2011; Stein i inni, 2007; Rostoks i inni, 2005; GrainGenes, *Hordeum-PilotOPA1-7H*) oraz marker typu SNP - *ABC255* zmapowany w rejonie genu *rh11* w pracy Kędziorskiego (2011). Wstępnie wytypowane interwały do poszukiwania nowych markerów obejmowały następujące dystanse na poszczególnych opublikowanych mapach: 7,51 cM (Muñoz-Amatriaín i inni, 2011), 5,99 cM (Stein i inni, 2007), 7,81 cM (Rostoks i inni, 2005), 11,99 cM (Close i inni, 2009; *SM_POPA123*), 33,64 cM (Close i inni, 2009; *MB_POPA123*), oraz 15,06 cM (GrainGenes, *Hordeum-PilotOPA1-7H*). Dane uzyskane z opublikowanych map genetycznych pozwoliły na wybór nowych markerów, które potencjalnie mogły znajdować się w docelowym przedziale chromosomu 7HS obejmującym gen *rh11*, a jednocześnie znana była ich pozycja na mapie fizycznej. W rezultacie wytypowano 54 sekwencje, które spełniały te założenia. Liczbę tę zawężono do 34 markerów, które przeanalizowano pod kątem polimorfizmu między mutantem *rh11.b* i odmianą 'Morex', co pozwoliło zidentyfikować 23 polimorficzne produkty. Wynik ten stanowił wystarczającą liczbę miejsc polimorficznych aby ostatecznie wybrać markery do genotypowania i zainicjować mapowanie (Aneks, Tab. 10.16). Weryfikacja wyników sekwencjonowania ujawniła, że wszystkie 34 fragmenty DNA pochodzące z wytypowanych markerów charakteryzowały się specyficzną sekwencją DNA oraz były odpowiedniej długości.

W celu wstępnego zakotwiczenia mapy genetycznej na mapie fizycznej genomu, wstępnie wytypowano tylko pięć markerów (*2_1491*; *1_0772*; *3_0752*; *3_530* oraz *00460*) do dalszej analizy. Fragmenty chromatogramów z pozycją SNP dla poszczególnych loci zamieszczono w aneksie (Ryc. 10.1; 10.2; 10.3). W celu genotypowania segregacji markerów w populacji mapującej dla sekwencji oznaczonych jako *2_1491* oraz *1_0772*, zastosowano technikę CAPS. Dla trzeciego z wytypowanych markerów, locus *3_0752* wykryty SNP *CG*→*AT*, nie prowadził do powstania ani do eliminacji miejsca restrykcyjnego, w związku z czym do przeprowadzenia genotypowania w oparciu o ten

marker wybrano technikę HRM. Z kolei, sekwencje oznaczono jako 3_530 oraz 00460, analizowano w oparciu o procedurę EcoTILLING.

Analiza nowo wytypowanych markerów składała się z dwóch etapów. W pierwszym przeprowadzono pilotażowy eksperyment badania segregacji markerów 2_1491, 1_0772, 3_0752, 3_530 oraz 005460 wśród wcześniej zidentyfikowanych 228 rekombinantów pomiędzy markerami SSR (GBM1464, scssr07970, EBmac0016) a locus *rh11* (Tab. 4.4). W przypadku markerów 2_1491, 1_0772 oraz 3_0752 wykryto odpowiednio 17, 4 oraz 6 rekombinantów w stosunku do locus *rh11*, co wstępnie sugerowało mniejszą odległość między tymi loci a genem *rh11*, w porównaniu do dystansu pomiędzy *rh11* a markerami SSR (GBM1464, scssr07970, EBmac0016). W przypadku markera 3_0530 zidentyfikowano aż 71 osobników heterozygotycznych. Taka obserwacja wskazywała na większą częstotliwość zdarzeń rekombinacji pomiędzy locus *rh11* a markerem 3_0530, dlatego też marker 3_0530, został wykluczony z dalszej analizy. Dla markera 00460 obserwowano zbyt słaby produkt amplifikacji na żelu poliakrylamidowym i ze względu na potencjalne problemy z wiarygodnym odczytem wyników zaniechano jego dalszej analizy.

Tabela 4.4. Segregacja markerów opracowanych na podstawie bazy Genome Zipper wśród 228 rekombinantów zidentyfikowanych pomiędzy markerami SSR (GBM1464, scssr07970, EBmac0016) a locus *rh11*.

Marker	Klasy genotypowe				
	a	h	b	c	x
2_1491	211	17	0	0	0
3_0752	222	6	0	0	0
1_0772	224	4	0	0	0
3_0530	96	71	0	0	132
<i>rh11</i>	228	0	0	0	0

a – homozygota z allelami badanego markera jak mutant *rh11.b*; b – homozygota z allelami markera SSR jak odmiana ‘Morex’; h – stan heterozygotyczny markera; c – genotyp inny niż ‘a’; x – brakujące dane

W drugim etapie, w celu weryfikacji ułożenia nowych markerów względem genu *rh11*, przeprowadzono wstępne mapowanie markerów SSR (GBM1464, scssr07970, EBmac0016) oraz markerów typu SNP (2_1491, 3_0752, 1_0772) w oparciu o 169 roślin pokolenia F₂ populacji *rh11.b* x ‘Morex’ wybranych losowo. Wyselekcjonowane osobniki reprezentowały subpopulację, w której stosunek roślin o fenotypie odmiany ‘Morex’ do osobników wykazujących recesywny fenotyp wynosi 3:1. Segregację markerów w potomstwie zweryfikowano za pomocą testu $\chi^2_{1:2:1}$ (Tab.4.5). W przypadku wszystkich badanych loci uzyskana wartości testu $\chi^2_{1:2:1}$ nie przekracza wartości granicznej

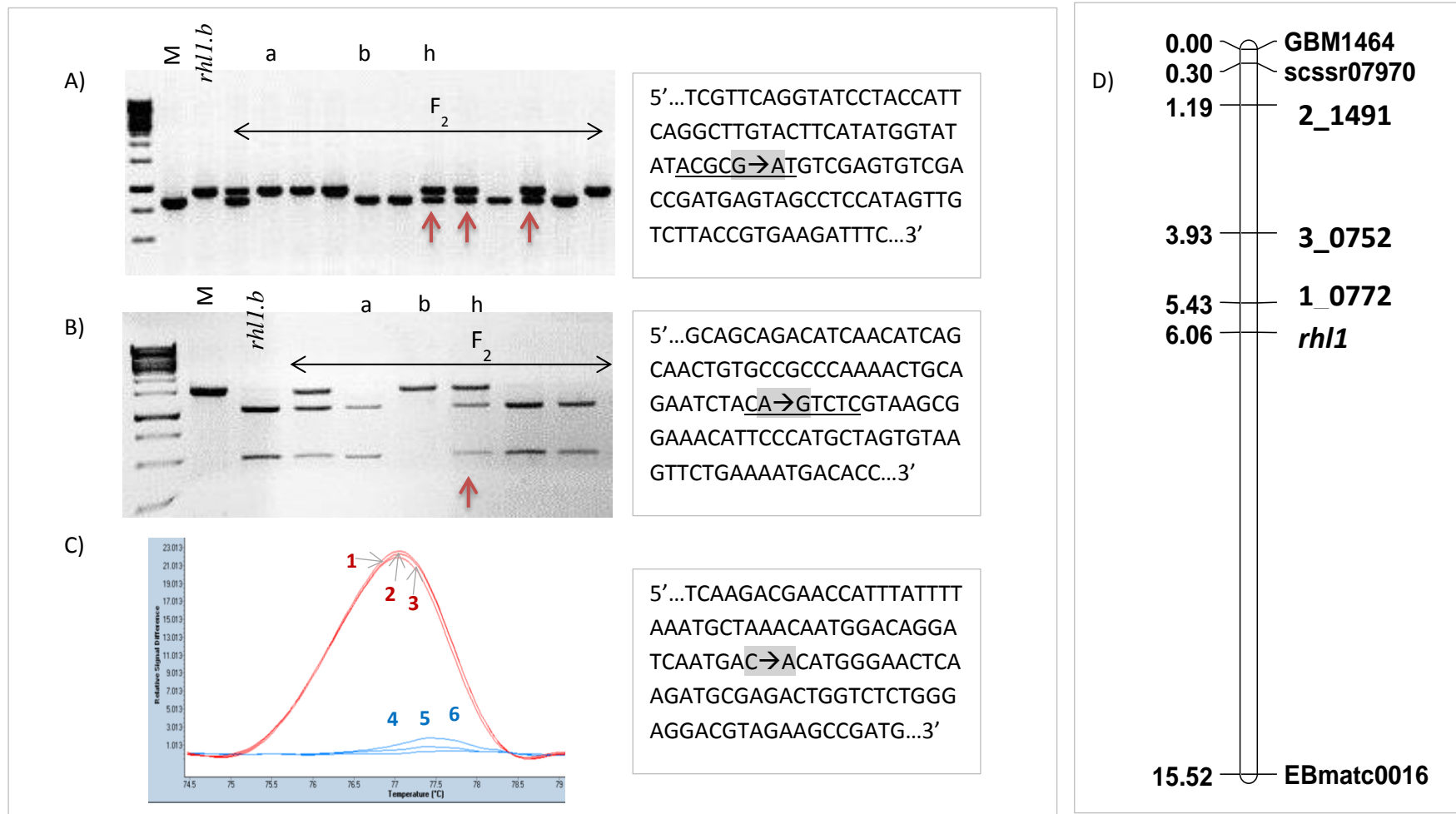
$\chi^2_{0.05}$ wynoszącej 5,99 dla $df = 2$ i $\alpha = 0,05$, na tej podstawie można wnioskować o segregacji zgodnej z założoną.

Tabela 4.5. Segregacja markerów w populacji mapującej *rh11.b* x ‘Morex’ obejmującej 169 osobników.

Marker	Źródło wyprowadzonego markera	Klasy genotypowe				Wartość testu $\chi^2_{1:2:1}$
		a	h	b	c	
GBM1464	SSR*	45	79	45	0	0.72
scssr07970	SSR*	44	78	46	0	0.90
2_1491	GZ	47	77	45	0	1.38
3_0752	GZ	49	74	46	0	2.72
1_0772	GZ	49	75	44	0	2.23
<i>rh11</i>	-	50	0	0	119	1.9
EBmatc0016	SSR*	37	83	49	0	1.76

* - markery SSR wybrane na podstawie mapy skonstruowanej we wcześniejszych analizach (Chmielewska i inni, 2014); a – homozygota z allelami badanego markera jak mutant *rh11.b*; b – homozygota z allelami badanego markera jak odmiana ‘Morex’; c – genotyp inny niż “a”; h – stan heterozygotyczny markera; GZ – Genome Zipper.

Dane o segregacji markerów posłużyły do przeprowadzenia mapowania za pomocą programu JoinMap 4.0 (Ryc. 4.2). Skonstruowano mapę sprzężeń dla mikro-populacji F_2 krzyżówki *rh11.b* x ‘Morex’ obejmującą 15,52 cM (Ryc. 4.2). Przeprowadzona analiza mapowania badanych markerów pozwoliła na umieszczenie markera 1_0772 w sąsiedztwie genu *rh11*, w odległości 0,63 cM. Z kolei markery 2_1491 oraz 3_0752 zlokalizowano w odległości odpowiednio 4,87 cM oraz 2,13 cM od locus *rh11*. Żaden z nowych markerów SNP nie flankował genu *rh11* od strony centromeru.



Rycina 4.2. Analiza segregacji markerów oraz konstrukcja mapy genetycznej dla w oparciu o mikro-populację. Przykładowe fragmenty obrazu żeli agarozowych przygotowanych w ramach analizy markerów A) 2_1491 B) 1_0772. M – odmiana rodzicielska ‘Morex’; *rhll.b* – bezwołośnikowy mutant, a – homozygota jak mutant *rhll.b*; b – homozygota jak odmiana ‘Morex’; h – stan heterozygotyczny markera. Czerwone strzałki wskazują rekombinanty pomiędzy genem *rhll.b*, a badanym markerem. W ramkach oznaczono fragment sekwencji analizowanych markerów, gdzie kolor szary wskazuje miejsce polimorfizmu, podkreślenie wyznacza sekwencję rozpoznawaną przez użyty enzym restrykcyjny. C) Wykres znormalizowanych krzywych topnienia przygotowany w ramach analizy markera 3_0752. Poszczególne krzywe reprezentują następujące próby DNA: 1 – ‘Morex’ + mutant *rhll.b*, 2- heterozygota, 3 – homozygota + ‘Morex’, 4 – ‘Morex’, 5 – mutant *rhll.b*, 6 – homozygota jak mutant. D) Grupa sprzężeń skonstruowana na podstawie subpopulacji mapującej F₂ *rhll.b* x ‘Morex’, obejmującej 169 osobników.

Wartości współczynników LOD, były wysokie zarówno pomiędzy sąsiadującymi loci jak i tymi, które nie leżą w bezpośrednim sąsiedztwie *rh11* (Tab. 4.6). Wysokie wartości LOD otrzymano dla sprzężenia pomiędzy locus *rh11*, a 1_0772 oraz 3_0752 odpowiednio 41,46 i 41,83 co świadczy o wysokim prawdopodobieństwie sprzężenia pomiędzy analizowanymi parami loci.

Tabela 4.6. Częstotliwość rekombinacji oraz wartość współczynnika LOD dla zmapowanych loci.

Locus 1	Locus 2	Częstotliwość rekombinacji	LOD
<i>rh11</i>	scssr07970	0,0295	35,32
	1_0772	0,0058	41,46
	2_1491	0,0173	38,42
	3_0752	0,0115	41,83
	GBM1464	0,0290	35,83
	EBmatc0016	0,0784	28,28
1_0772	2_1491	0,0241	61,00
	3_0752	0,0150	67,56
	scssr07970	0,0273	59,61
	GBM1464	0,0302	58,43
	EBmatc0016	0,0868	41,64
3_0752	scssr07970	0,0241	61,97
	GBM1464	0,0270	61,03
	EBmatc0016	0,0830	42,95
	2_1491	0,0270	61,78
2_1491	GBM1464	0,0119	67,86
	EBmatc0016	0,0927	38,91
	scssr07970	0,0090	69,62
EBmatc0016	scssr07970	0,0869	39,03
	GBM1464	0,0928	37,87
GBM1464	scssr07970	0,0030	73,19

Utworzenie mapy sprzężeń opartej na mikropopulacji pozwoliło na zainicjowanie procedury mapowania wysokorozdzielczego, gdyż nowo zmapowane markery typu SNP posłużyły do zakotwiczenia mapy genetycznej na fizycznej mapie genomu jęczmienia. Sekwencje dla trzech markerów: 2_1491, 3_0752 oraz 1_0772 wykorzystano do przeszukiwania internetowej bazy danych Ensembl Plants, w celu identyfikacji pozycji zmapowanych rejonów w genomie jęczmienia (Tab. 4.7).

Tabela 4.7. Lokalizacja zmapowanych markerów na fizycznej mapie genomu jęczmienia.

Locus	Pozycja (cM)¹	Pozycja na fizycznej mapie genomu jęczmienia (pz)
2_1491	48,9	57 324 195-57 326 153
3_0752	53,60	65 928 575-65 929 562
1_0772	54,37	67 121 258-67 124 410

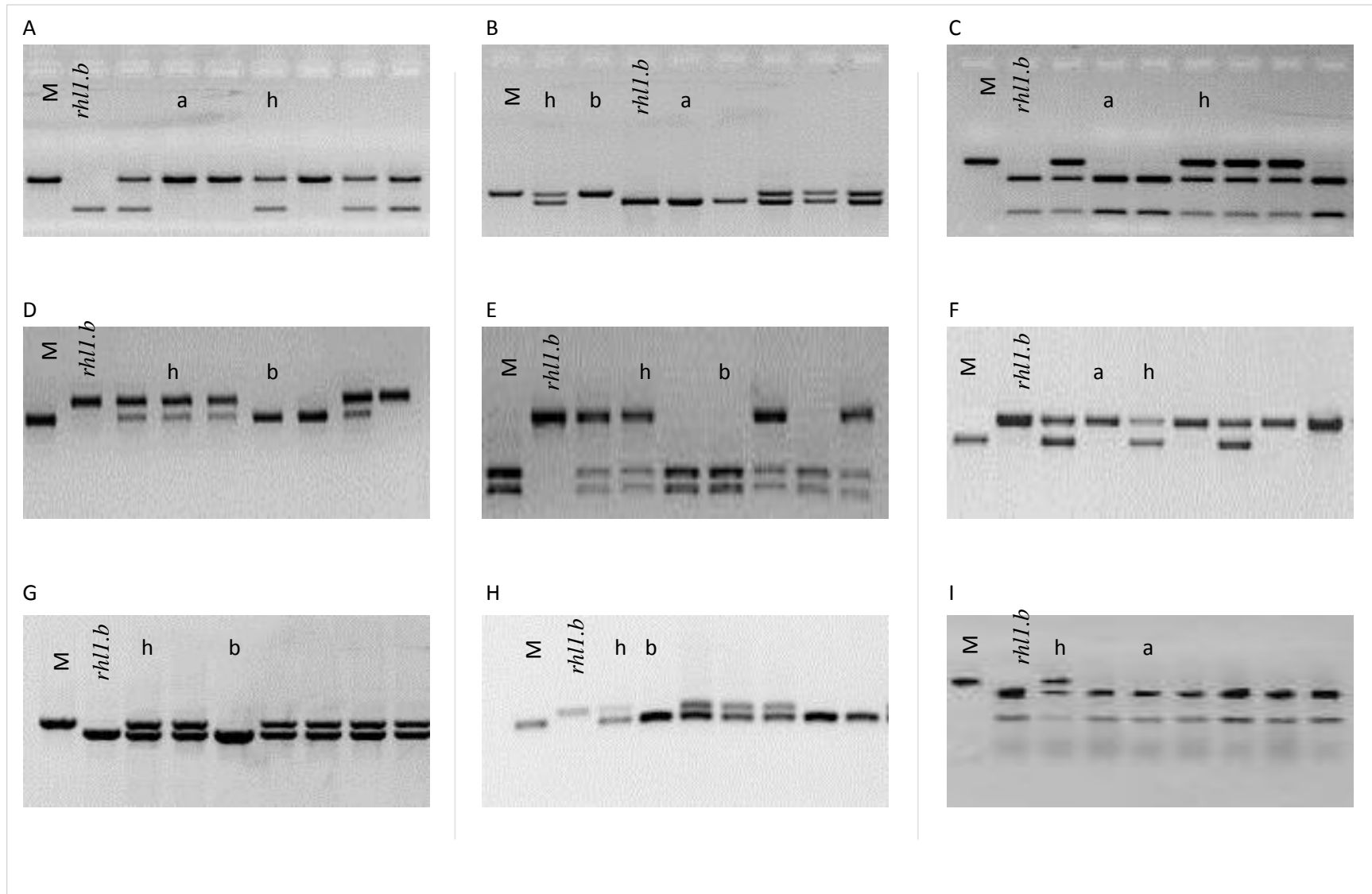
¹ – genetyczna pozycja wg internetowej bazy GenomeZipper

4.4. Wyprowadzanie nowych markerów typu SNP w oparciu o mapę fizyczną genomu jęczmienia oraz konstrukcja mapy genetycznej na podstawie powiększonej populacji

Markery 2_1491, 1_0772, oraz 3_0752 wybrano jako początek etapu wysycenia mapy genetycznej. Ze względu na brak nowo zmapowanego markera typu SNP flankującego poszukiwany gen od strony centromeru, czyli markera który mógłby posłużyć jako flankujące miejsce zakotwiczenia na mapie fizycznej, wybrano szeroki interwał od 58 965 839 pz do 163 649 998 pz na fizycznej mapie genomu jęczmienia według bazy Ensembl Plants. Wstępnie, w wyznaczonym przedziale losowo wytypowano 70 potencjalnych markerów, które mogłyby być zlokalizowane bliżej genu *rh11* (Aneks, Tab. 10.17). Po przeprowadzeniu amplifikacji wybranych loci dla genotypów rodzicielskich, otrzymane produkty poddano sekwencjonowaniu celem sprawdzania ich polimorfizmu między osobnikami rodzicielskimi populacji mapującej. Łącznie, przeprowadzono analizę dla 118 fragmentów DNA, które sumarycznie obejmowały 93930 pz. Zidentyfikowano 81 polimorficznych produktów reakcji PCR, które stanowią 68,64% w stosunku do wszystkich analizowanych fragmentów. Zidentyfikowane różnice pomiędzy genotypami mutantu *rh11* i odmiany ‘Morex’, w obrębie zamplifikowanych fragmentów, obejmują 284 polimorfizmy typu SNP oraz 20 zmian typu InDel. Należy zaznaczyć, że identyfikacja 81 polimorficznych produktów następowała sukcesywnie, przy jednoczesnym włączaniu kolejnych, nowych markerów do mapy, co pozwalało na weryfikację ich lokalizacji względem badanego genu. W związku z tym, wielkość przeszukiwanego fizycznego interwału ulegała stopniowemu zawężaniu w trakcie prowadzonych analiz. W celu precyzyjnej lokalizacji nowych markerów w obrębie grupy sprzężeń zawierającej gen *rh11*, równoległe z prowadzeniem sekwencjonowania nowo wytypowanych markerów, przeprowadzono genotypowanie wybranych sekwencji z wcześniej zidentyfikowanym polimorfizmem, z wykorzystaniem populacji mapującej krzyżówki *rh11.b* x ‘Morex’ złożonej z 1472 roślin F₂ (Ryc. 4.3). Po każdym włączeniu

nowego markera do mapy genetycznej wyznaczano nowy interwał poszukiwania polimorfizmów, odrzucając część wcześniej wyselekcjonowanych sekwencji, które nie znajdowały się w nowym regionie. Tak prowadzona analiza spowodowała, że istotna liczba polimorficznych sekwencji nie została wykorzystana jako markery w konstrukcji mapy genetycznej w powiększonej populacji. Ponadto, z każdego nowego interwału analizie poddawano kilkanaście sekwencji, aby zwiększyć prawdopodobieństwo znalezienia prostej i możliwie mało kosztochłonnej metody genotypowania polimorficznych loci, preferencyjnie techniką CAPS lub poprzez bezpośrednią elektroforezę w żelu agarozowym. Fragmenty chromatogramów obejmujące pozycje polimorficznych miejsc dla nowo wybranych markerów zamieszczono w aneksie (Ryc. 10.2; 10.3).

Fragmenty chromatogramów obejmujące pozycje polimorficznych miejsc i uzyskane na podstawie analizy wyników sekwencjonowania dla loci opisanych poniżej zamieszczono w aneksie (Ryc. 10.1; 10.2). Dla sekwencji oznaczonych jako MLOC_36745, MLOC_61391, MLOC_56159, MLOC_58272, MLOC_35776, MLOC_56159 oraz MLOC_35776 zidentyfikowano polimorfizmy typu SNP. Zmiany te znajdowały się w miejscach restrykcyjnych co umożliwiło zastosowanie techniki CAPS do genotypowania populacji mapującej (Ryc. 4.3). Z kolei dla sekwencji MLOC_61880, MLOC_74692, MLOC_12900, oraz MLOC_56157 wykryto polimorfizmy typu In/Del. Dla tych markerów różnica w długości pomiędzy produktami PCR uzyskiwanymi na matrycy DNA mutanta *rhl1.b* a odmiany 'Morex' pozwoliła na zastosowanie elektroforezy w żelu agarozowym w celu genotypowania (Ryc. 4.3).



Rycina 4.3. Przykładowe fragmenty obrazów żeli agarozowych przygotowane w ramach analizy markerów A) MLOC_36745, B) MLOC_61880, C) MLOC_61391, D) MLOC_74692, E) MLOC_12900, F) MLOCL_58272, G) MLOC_56157, H) MLOC_56159 I) MLOC_35776. M – odmiana rodzicielska ‘Morex’; *rhll.b* – bezwłosnikowy mutant, a – homozygota jak mutant *rhll.b*; b – homozygota jak odmiana ‘Morex’; h – stan heterozygotyczny markera.

Pierwszymi markerami wybranym do genotypowania były sekwencje wytypowane podczas prowadzenia etapu mapowania na małej populacji tzn. markery 2_1491 oraz 1_0772. Ze względu na zbyt wysokie koszty enzymu *Esp3I* nie prowadzono genotypowania markera 1_077 dla powiększonej populacji mapującej. Kolejnymi wytypowanymi markerami były sekwencje oznaczone jako MLOC_36745, MLOC_61880 oraz MLOC_61391. Dane o segregacji tych sekwencji, markerów 2_1491 i 1_0772 oraz dla trzech wcześniej wyselekcjonowanych markerów SSR (GBM1464, scssr07970, EBmac0016) posłużyły do przeprowadzenia mapowania za pomocą programu JoinMap 3.0 w populacji 1472 roślin F₂. W wyniku tej analizy mapa genetyczna odcinka chromosomu 7HS jęczmienia, niosąca locus *rh11* została wzbogacona o trzy nowe markery typu SNP oraz jeden typu In/Del. Ze względu na fakt, iż nowe markery zlokalizowane były tylko po jednej stronie genu *rh11*, dystalnie w stosunku do niego, kolejną sekwencją wytypowaną do analizy był marker MLOC_74692, znacznie oddalony od wcześniej zmapowanych sekwencji i znajdujący się w pozycji 96 923 046 - 96 923 798 pz na mapie fizycznej genomu jęczmienia. Ostatecznie, zmapowana sekwencja MLOC_74692 stała się markerem flankującym gen *rh11* z drugiej strony (proksymalnie), w związku z czym zakotwiczone mapę genetyczną na fizycznej mapie genomu jęczmienia i wybrano nowy interwał, obejmujący region od 58 965 839 pz do 96 923 798 pz, który służył do dalszego poszukiwania markerów. Analiza ta pozwoliła na wybór markerów MLOC_12900 oraz MLOC_58272, które poddano analizie w populacji F₂ i zlokalizowano na mapie po stronie proksymalnej genu *rh11*. Umożliwiło to ponowne wybranie interwału do poszukiwania kolejnych markerów, bliżej flankujących gen. W ostatnim etapie analiza segregacji dla trzech loci MLOC_56157, MLOC_56159 oraz MLOC_35776 umożliwiła ponowne zawężenie interwału przeznaczonego do typowania genów kandydackich.

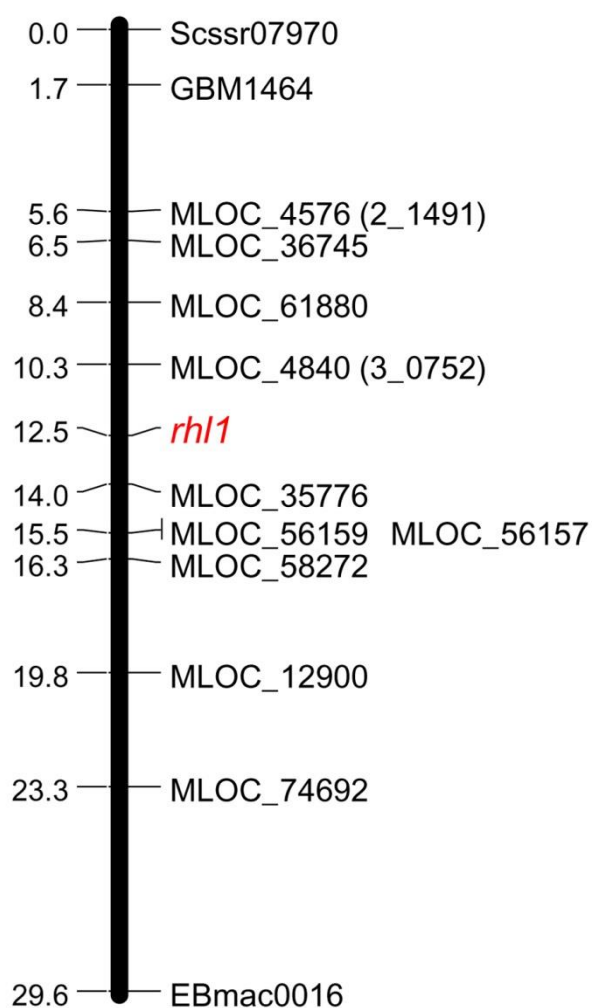
Segregację markerów w populacji mapującej zweryfikowano za pomocą testu $\chi^2_{1:2:1}$ (Tab. 4.8). Jeden marker, MLOC_61391, został wyłączony z analizy, ze względu na odchylenie od prawidłowej segregacji, powodujące błędne pozycjonowanie kilku loci na mapie genetycznej. Dla pozostałych loci uzyskano segregacji zgodną z przewidywaną.

Tabela 4.8. Analiza segregacji markerów oraz wartość testów χ^2 w populacji mapującej *rh11.b* x ‘Morex’ obejmującej 1472 osobników.

Locus	Źródło markera	Klasa genotypowa					χ^2
		a	h	b	c	x	
Scsrr07970	SSR*	366	728	378	0	0	0,37
GBM1464	SSR*	364	736	372	0	0	0,09
MLOC_4576 (2_1491)	GZ	367	722	368	0	15	0,12
MLOC_36745	EP	368	728	376	0	0	0,26
MLOC_61880	EP	382	702	387	0	1	3,09
MLOC_4840 (3_0752)	GZ	376	719	376	0	1	0,74
MLOC_35776	EP	387	699	385	0	1	3,63
<i>rh11</i>		393	0	0	1079	0	0,99
MLOC_61391	EP	380	764	327	0	1	6,03
MLOC_56157	EP	385	705	382	0	0	2,62
MLOC_56159	EP	385	705	382	0	0	2,62
MLOC_58272	EP	378	716	376	0	2	0,99
MLOC_12900	EP	353	737	368	0	14	0,48
MLOC_74692	EP	335	741	372	0	24	2,69
EBmac0016	SSR*	338	741	372	0	21	2,26

* - markery SSR wybrane na podstawie mapy skonstruowanej we wcześniejszych analizach (Chmielewska i inni, 2014); a – homozygota jak mutant *rh11.b*; b – homozygota jak odmiana ‘Morex’; c – genotyp inny niż ‘a’; h – stan heterozygotyczny badanego markera; x – brakujące dane; GZ – Genome Zipper; EP – Ensembl Plants

Ostatecznie skonstruowano mapę sprzężeń dla populacji F_2 *rh11.b* x ‘Morex’, która obejmuje 29,6 cM (Ryc. 4.4). Siedem markerów typu SNP, cztery typu In/Del oraz trzy SSR leżą w grupie sprzężeń obejmującej gen *rh11*. Mapa zawiera trzy markery SSR opracowane we wcześniejszych badaniach (Chmielewska i inni, 2014), dwa markery pobrane z bazy danych Genome Zipper i osiem loci reprezentujących geny jęczmienia z bazy danych Ensembl Plants, (wersja 082214v1). Najbliżej genu *rh11* leżą markery MLOC_4840 (2,2 cM) oraz MLOC_35776 (1,5 cM) i tworzą interwał o długości 3,7 cM.



Ryciana 4.4. Mapa genetyczna obejmująca grupę sprzężeń skonstruowana na podstawie populacji mapującej F_2 *rhl1.b* x 'Morex' liczącej 1472 osobników, w tym 1079 roślin o fenotypie dzikim oraz 393 roślin bezwłosnikowych.

Współczynniki LOD dla poszczególnych par loci obejmowały zakres wartości od 278,67 do 671,48, co wskazuje na wysokie prawdopodobieństwo sprzężenia między tymi parami. Ponadto wysokie wartości LOD uzyskano dla sprzężenia pomiędzy locus *rhl1*, a MLOC_35776, MLOC_56157 oraz MLOC_56159 odpowiednio 355,15; 351,27 oraz 351,27 (Tab. 4.9).

Tabela 4.9. Częstość rekombinacji oraz wartość współczynnika LOD dla zmapowanych loci.

Locus 1	Locus 2	Częstość rekombinacji	LOD	Locus 1	Locus 2	Częstość rekombinacji	LOD
<i>rhl1</i>	scssr07970	0,0183	320,15	3_0752	MLOC_35776	0,0234	545,85
	2_1491	0,0170	320,63		MLOC_36745	0,0314	507,38
	3_0752	0,0115	335,21		MLOC_56157	0,0269	530,66
	GBM1464	0,0196	317,21		MLOC_56159	0,0269	530,66
	EBmatc0016	0,0380	282,33		MLOC_58272	0,0336	502,42
	MLOC_12900	0,0273	300,88		MLOC_61880	0,0185	562,67
	MLOC_35776	0,0041	355,15		MLOC_74692	0,0769	369,43
	MLOC_36745	0,0169	323,01		EBmac0016	0,0853	353,00
	MLOC_56157	0,0054	351,27		GBM1464	0,0477	453,29
	MLOC_56159	0,0054	351,27		Scssr07970	0,0448	462,92
	MLOC_58272	0,0101	338,38		MLOC_36745	0,0265	531,67
	MLOC_61880	0,0075	345,55		MLOC_56157	0,0151	585,17
	MLOC_74692	0,0402	278,67		MLOC_56159	0,0151	585,17
	2_1491	0,0567	415,38		MLOC_58272	0,0203	560,36
3_0752	0,0565	420,95	MLOC_35776	MLOC_61880	0,0134	589,68	
MLOC_35776	0,0471	459,70		MLOC_74692	0,0668	406,62	
MLOC_36745	0,0561	421,35		EBmac0016	0,0853	364,52	
MLOC_56157	0,0328	504,60		GBM1464	0,0441	470,18	
MLOC_12900	MLOC_56159	0,0328	504,60		Scssr07970	0,0413	479,71
	MLOC_58272	0,0335	496,88		MLOC_56157	0,0314	513,36
	MLOC_61880	0,0442	463,79		MLOC_56159	0,0314	513,36
	MLOC_74692	0,0337	490,20	MLOC_36745	MLOC_58272	0,0325	504,90
	EBmac0016	0,0568	413,89		MLOC_61880	0,0189	563,95
	GBM1464	0,0678	388,21		MLOC_74692	0,0787	364,41

Tabela 4.9. cd.

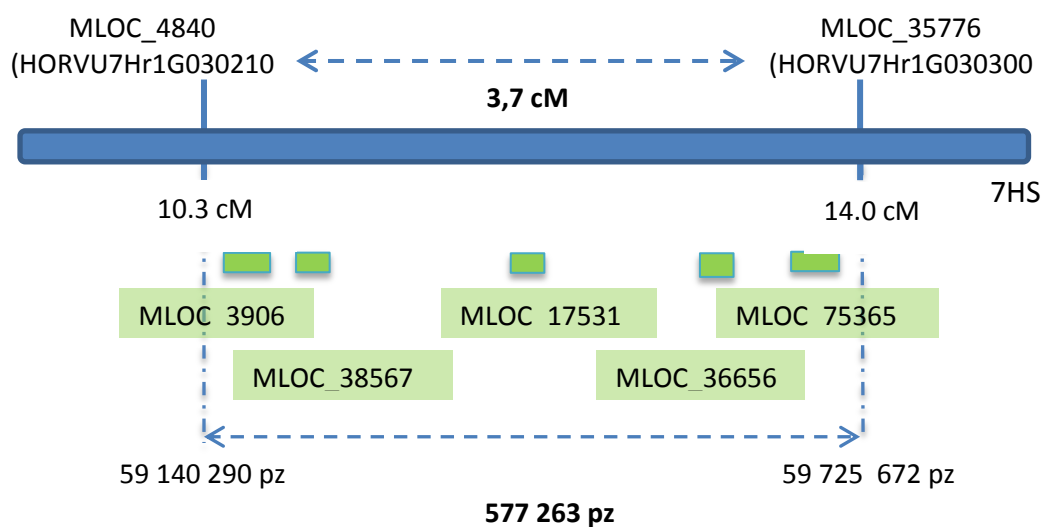
Locus 1	Locus 2	Częstość rekombinacji	LOD	Locus 1	Locus 2	Częstość rekombinacji	LOD
MLOC_12900	Scssr07970	0,0663	393,54	MLOC_36745	EBmac0016	0,0936	333,51
	3_0752	0,0307	504,70		GBM1464	0,0360	493,34
	MLOC_35776	0,0296	515,78		Scssr07970	0,0381	485,76
	MLOC_36745	0,0086	604,68		MLOC_74692	0,0642	406,88
	MLOC_56157	0,0331	502,77		EBmac0016	0,0812	369,75
2_1491	MLOC_56159	0,0331	502,77	MLOC_61880	GBM1464	0,0349	502,28
	MLOC_58272	0,0356	490,44		Scssr07970	0,0311	514,69
	MLOC_61880	0,0215	548,97	EBmac0016	0,0602	400,75	
	MLOC_74692	0,0803	357,69	MLOC_74692	GBM1464	0,0886	338,39
	EBmac0016	0,0943	328,71		Scssr07970	0,0832	350,33
	GBM1464	0,0363	487,27	EBmac0016	GBM1464	0,0910	342,87
	Scssr07970	0,0381	481,81		Scssr07970	0,0861	353,84
	MLOC_58272	0,0079	617,03		MLOC_56159	0,0000	671,48
	MLOC_61880	0,0168	573,46		MLOC_58272	0,0079	617,03
	MLOC_56159	MLOC_74692	0,0168	573,46	MLOC_61880	0,0168	573,46
EBmac0016		0,0711	393,46	MLOC_56157	MLOC_74692	0,0554	433,39
GBM1464		0,0476	459,30		EBmac0016	0,0711	393,46
Scssr07970		0,0427	474,66		GBM1464	0,0476	459,30
GBM1464		Scssr07970	0,0171	568,96	Scssr07970	0,0427	474,66

4.5. Charakterystyka przedziału fizycznego obejmującego locus *rh11* i funkcjonalna analiza genów kandydackich

Charakterystykę zidentyfikowanego przedziału oparto na nowej wersji genomu jęczmienia (wersja Hv_IBSC_PGSR_v2), gdzie identyfikatory genów zostały zmienione z MLOC na HORVU. W związku z tym znaleziono nowe odpowiednie identyfikatory dla markerów, które są stosowane w dalszej analizie (Tab. 4.10). Porównanie opracowanej mapy genetycznej fragmentu chromosomu 7HS z fizyczną mapą wykazało, że kolejność zmapowanych markerów koresponduje z ich ułożeniem na fizycznej mapie genomu jęczmienia. Marker MLOC_4840 (HORVU7Hr1G030210) zlokalizowany jest w pozycji 59 140 290 – 59 141 279 pz, z kolei marker MLOC_35776 (HORVU7Hr1G030300) znajduje się w pozycji 59 718 542 – 59 725 672 pz. Interwał utworzony przez te dwa flankujące markery wynosi 577 263 pz na mapie fizycznej chromosomu 7HS jęczmienia (Ryc. 4.5).

Tabela 4.10. Identyfikatory genów MLOC oraz odpowiadające im oznaczenia HORVU zgodne z wersją genomu jęczmienia Hv_IBSC_PGSR_v2, dla wszystkich genotypowanych loci.

Identyfikator markera	
MLOC ID	HORVU ID
MLOC_4579 (Zip_2_1491)	HORVU7Hr1G028840 / HORVU7Hr1G028850
MLOC_36745	HORVU7Hr1G028950
MLOC_61880	HORVU7Hr1G030050
MLOC_4840 (3_0752)	HORVU7Hr1G030210
MLOC_39064	HORVU7Hr1G030220
MLOC_38567	HORVU7Hr1G030250
MLOC_38567	HORVU7Hr1G030250
MLOC_17531	HORVU7Hr1G030270
MLOC_36656	HORVU7Hr1G030280
MLOC_75365	HORVU7Hr1G030290
MLOC_35776	HORVU7Hr1G030300
MLOC_61391	HORVU7Hr1G030840 / HORVU7Hr1G030850
MLOC_56157	HORVU7Hr1G031330 / HORVU7Hr1G031350
MLOC_56159	HORVU7Hr1G031320
MLOC_58272	HORVU7Hr1G031260
MLOC_12900	HORVU7Hr1G033430
MLOC_74692	HORVU7Hr1G036960



Rycina 4.5. Schematyczne przedstawienie porównania opracowanej mapy genetycznej fragmentu chromosomu 7HS z fizyczną mapą. Niebieski prostokąt – fragment mapy genetycznej; zielone prostokąty – geny zlokalizowane w wytypowanym rejonie mapy fizycznej.

W obrębie wyznaczonego rejonu znajduje się pięć genów, które stanowią sekwencje o wysokiej wiarygodności oraz dobrze opisanej strukturze i pozycji (Tab. 4.11). Całkowita długość tych genów to 2,31% analizowanego regionu obejmującego 577 263 pz. Analiza sekwencji pod względem elementów powtarzalnych ujawniła, że sekwencje rozproszone zajmują 238047 pz, a 41,24% z nich należy do retroelementów. Zdecydowana większość tych elementów reprezentuje klasy retrotranspozonów LTR, głównie z podtypów Tyl/Copia i Gypsy/DIRS1 (odpowiednio 18,18% i 19,46%). Znacznie mniejszy ułamek przedziału, liczący 741 pz, składał się z retroelementów klasy LINE. Szczegółowe informacje odnoszące się do typów sekwencji klasyfikowanych jako poszczególne rejony genomu zamieszczono w aneksie (Aneks 2, w pliku Aneks2.docx, Tab. 1). Należy podkreślić, że blisko 56% genomu stanowiły sekwencje bez adnotacji w nowej wersji genomu jęczmienia.

Tabela 4.11. Podsumowanie adnotacji interwału fizycznego obejmującego locus *rh11*.

Klasa sekwencji	Sumaryczna długość [pz]	Część zajmowanego interwału [%]
Retroelementy:	217 999	37,8
Transpozony DNA:	20 048	3,5
Proste powtórzenia	3 513	0,6
Powtórzenia o niskiej złożoności	347	0,1
Satelitarny DNA	158	0,03
Sekwencje kodujące wysokiej wiarygodności	13 352	2,3
Rejon bez adnotacji	321 846	55,7
Suma	577 263	100

Każdy z genów zlokalizowanych w wybranym przedziale mapy fizycznej został scharakteryzowany na podstawie jego ontologii i porównania sekwencji stosując algorytm BLAST, wykorzystano sekwencje białkowe zdeponowane w bazie Ensembl Plants z najbardziej prawdopodobnymi ortologami u *A. thaliana*, *O. sativa* i *B. distachyon* (Tab. 4.12). Analiza ta, razem z informacjami literaturowymi na temat funkcji ortologicznych genów u *Arabidopsis*, umożliwiła identyfikację procesów fizjologicznych i biochemicznych, w które geny te mogą być zaangażowane. W przypadku genu HORVU7Hr1G030220 (MLOC_39064) stwierdzono, że najprawdopodobniej koduje on białko z grupy RTF2 z domeną RING. U *A. thaliana* wykazano, że mutacja w genie homologicznym (AT5G58020) powoduje zaburzenia w procesie splicingu. Mutanty u *A. thaliana* w genie AT5G58020 przejawiają poważne zaburzenia w procesie embriogenezy i obumierają zaraz po kiełkowaniu (Sasaki i inni, 2015). Białka z grupy RTF2 pośredniczą również w procesie terminacji replikacji. Kolejny gen HORVU7Hr1G030270 (MLOC_17531) prawdopodobnie koduje czynnik transkrypcyjny z domeną palca cynkowego z rodziny białek Krüppel. Białka należące do tej grupy zaangażowane są w różne procesy rozwojowe m.in. kwitnienie roślin oraz odgrywają rolę w szlaku regulacyjnym zaprogramowanej śmierci komórki. Z kolei gen HORVU7Hr1G030280 (MLOC_36656) przypuszczalnie koduje białko będące elementem strukturalnym małej podjednoski rybosomu. Dla produktu białkowego genu HORVU7Hr1G030290 (MLOC_75365) przypisano udział w polarnej lokalizacji białek podczas asymetrycznego podziału komórki. Z kolei homologi genu HORVU7Hr1G030250 (MLOC_38567) kodują czynniki transkrypcyjne bHLH z aktywnością dimeryzacji np. u *A. thaliana* i *O. sativa*. Analizy wskazują, że geny HORVU7Hr1G030250 oraz HORVU7Hr1G030290 są najbardziej obiecującymi kandydatami, jednakże

należy zaznaczyć, iż w przypadku genu HORVU7Hr1G030290 przewidywania były oparte jedynie na automatycznie przypisanej ontologii, ze względu na brak homologicznego białka u *A. thaliana*.

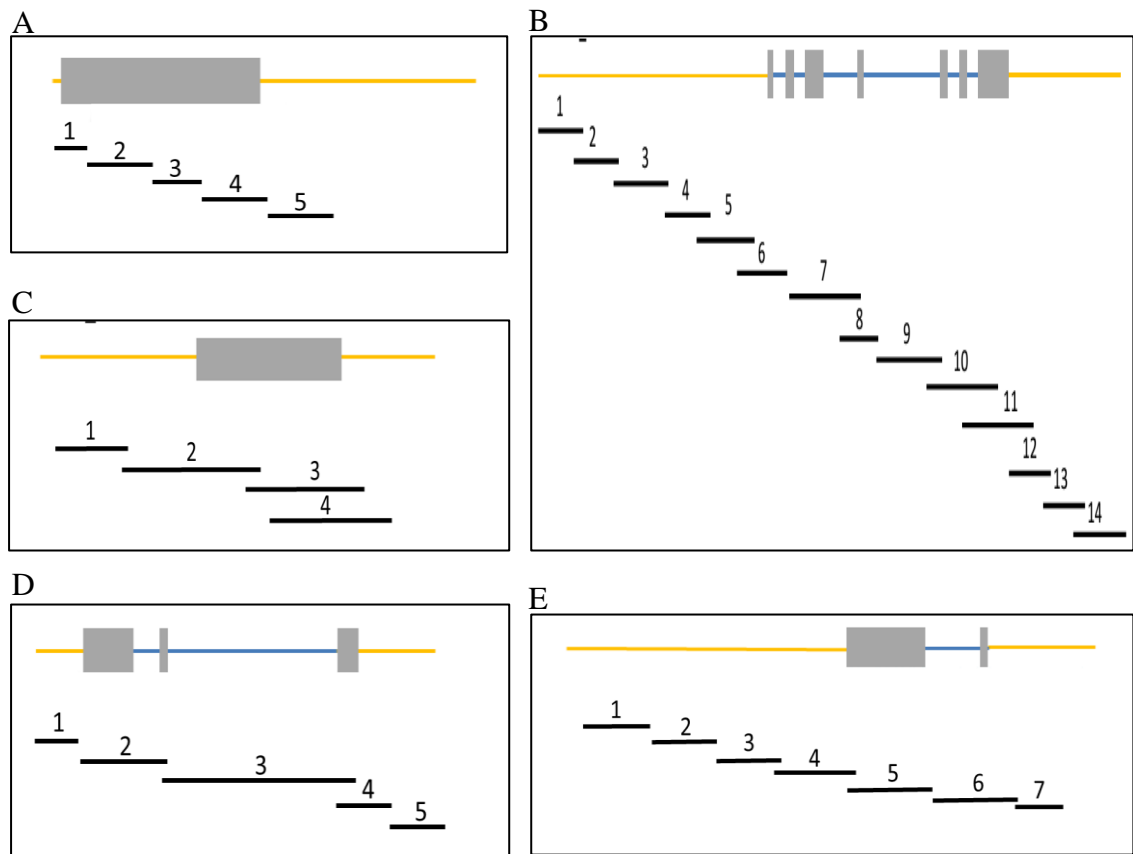
Tabela 4.12. Przypuszczalna funkcja i ortologi pięciu genów z przedziału między markerami MLOC_4840 (HORVU7Hr1G030210) i MLOC_35776 (HORVU7Hr1G030300 flankującymi locus *rhl1*).

Identyfikator genu HORV*	Identyfikator genu MLOC**	Produkt genu	Prawdopodobny ortolog		
			<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Brachypodium distachyon</i>
HORVU7Hr1G030220	MLOC_39064	Białko RTF2 RING-finger zaangażowane w terminację replikacji DNA	AT5G58020	OS06G0183900	BRADI1G47360
HORVU7Hr1G030250	MLOC_38567	Czynnik transkrypcyjny bHLH z aktywnością dimeryzacji	AT2G24260	OS06G0184000	BRADI1G47350
HORVU7Hr1G030270	MLOC_17531	Czynnik transkrypcyjny należący do rodziny Krüppel	AT5G16950	OS01G0258600	BRADI1G47340
HORVU7Hr1G030280	MLOC_36656	Białko rybosomalne	AT5G52370	OS02G0481000	BRADI3G43520
HORVU7Hr1G030290	MLOC_75365	Białko zaangażowane w lokalizację polarną podczas asymetrycznego podziału komórek	brak	Os02g0795200	BRADI1G47330

* Identyfikator HORVU - identyfikator genu według wersji genomu jęczmienia Hv_IBSC_PGSB_v2; ** Identyfikator MLOC - identyfikator genu zgodnie z wersją genomu jęczmienia 082214v1.

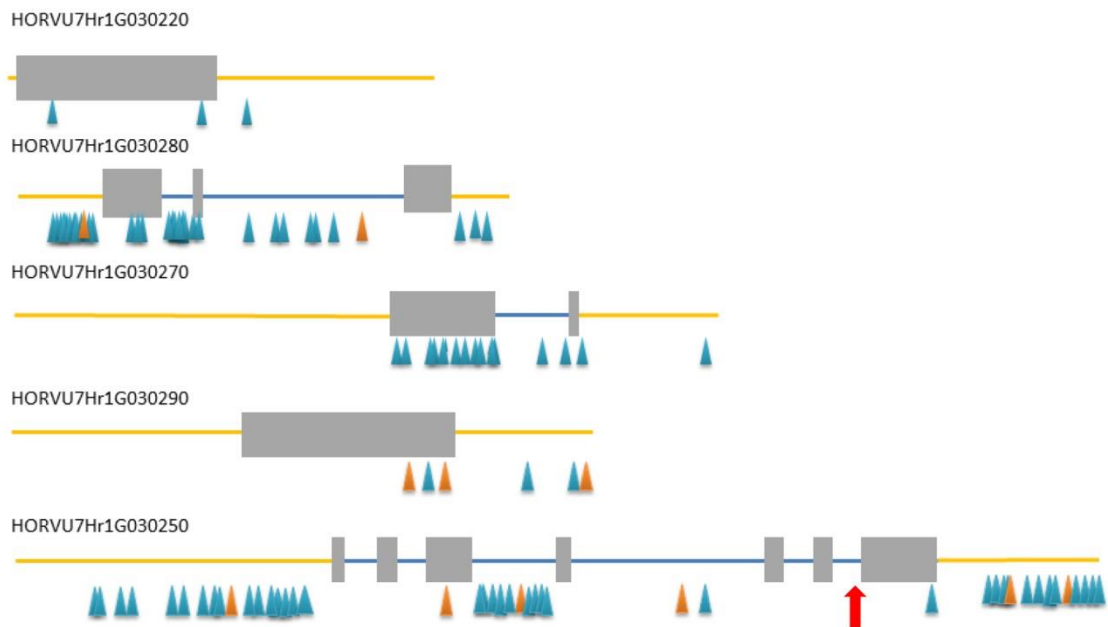
4.6. Sekwencjonowanie genów kandydackich i identyfikacja mutacji w genie HORVU7Hr1G030250

W celu identyfikacji mutacji, która mogłaby stanowić podłoże zmienionego fenotypu wszystkie pięć genów kandydackich poddano sekwencjonowaniu u mutantu *rhl1.b* i jego rodzicielskiej odmiany ‘Karat’. Startery do amplifikacji genów zostały zaprojektowane w taki sposób, aby objąć całą strukturę ekson-intron każdego genu (Ryc. 4.6; Aneks, Tab. 10.18; Tab. 10.19). Łącznie przeanalizowano 37 fragmentów genów o sumarycznej długości 21165 pz. Dodatkowo, procedurę amplifikacji i dwukierunkowego sekwencjonowania przeprowadzono również dla odmiany ‘Morex’, co pozwoliło odkryć miejsca polimorficzne między mutantem a odmianą, które były użyteczne do analizy sprzężeń w populacji mapującej (Ryc. 4.7).

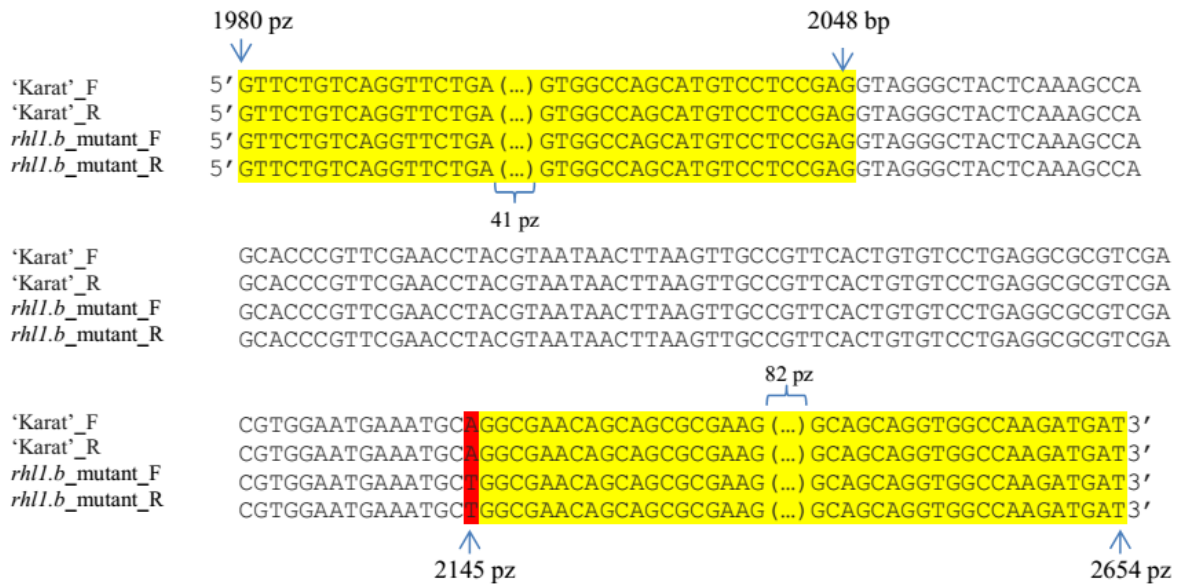


Rycina 4.6. Lokalizacja staterów projektowanych w celu sekwencjonowania genów kandydackich. A) MLOC_39064 (HORVU7Hr1G030270); B) MLOC_38567 (HORVU7Hr1G030250); C) MLOC_75365 (HORVU7Hr1G030290); D) MLOC_36656 (HORVU7Hr1G030280); E) MLOC_17531 (HORVU7Hr1G030270). Numery fragmentów podano zgodnie z aneksem (Tab. 10.18). Szare prostokąty - eksony, niebieskie linie - introny, żółta linia – region upstream i downstream.

Tylko w jednym genie, kodującym przypuszczalny czynnik transkrypcyjny bHLH (HORVU7Hr1G030250) stwierdzono obecność mutacji punktowej A→T między mutantem *rh11.b* a odmianą ‘Karat’ (Ryc. 4.7; Ryc. 4.8; Aneks 2, Ryc. 1 w pliku Aneks2.*docx). Zmiana zlokalizowana jest w pozycji 2145 pz od kodonu start w sekwencji HORVU7Hr1G030250. Sekwencjonowanie fragmentu genu bHLH (HORVU7Hr1G030250) dla allelicznych mutantów *rh11.a* i *rh11.c* wykazało obecność mutacji w tej samej pozycji jak u badanego mutantu *rh11.b* co świadczy o tym, że są to formy pochodzące z tego samego zdarzenia mutacyjnego (Aneks, Ryc. 10.4). Dla żadnego z pozostałych genów kandydackich nie zidentyfikowano różnic pomiędzy mutantem *rh11.b*, a odmianą ‘Karat’.



Rycina 4.7. Struktury pięciu genów kandydackich zlokalizowanych w docelowym interwale wokół genu *rh11*. Szare prostokąty - eksony, niebieskie linie - introny, żółta linia – region upstream i downstream, niebieskie / pomarańczowe trójkąty - polimorfizmy SNP / InDel wykryte w amplikonie między mutantem *rh11* i odmianą Morex, czerwona strzałka – miejsce mutacji.

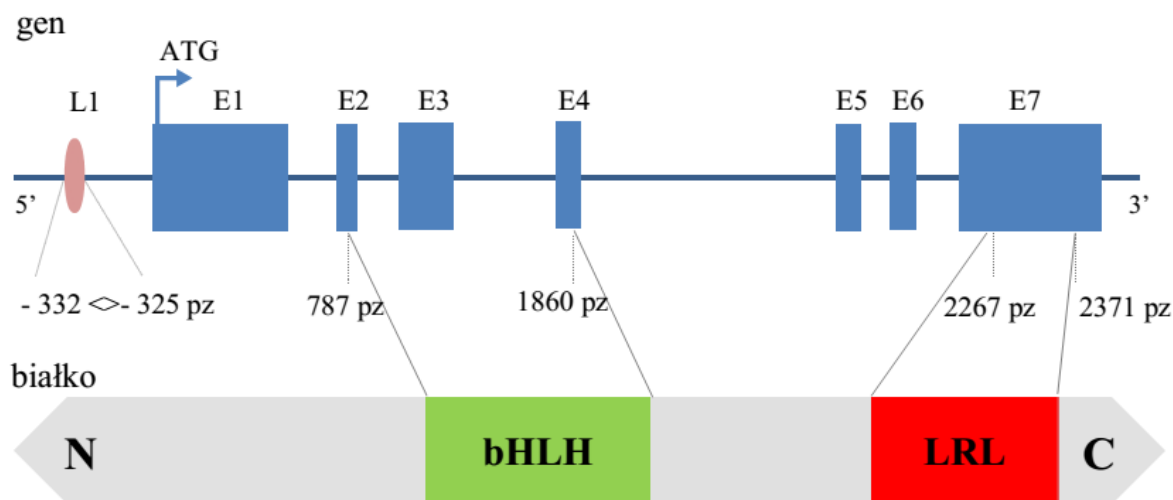


Rycina 4.8. Porównanie fragmentu sekwencji genu HORVU7Hr1G030250 dla mutantu *rh11.b* i jego odmiany wyjściowej 'Karat'. Zmieniony allel zawiera mutację punktową A → T. Żółty kolor reprezentuje eksony szósty i siódmy, czerwone podkreślenie wyznacza miejsce mutacji.

4.7. Charakterystyka strukturalna i funkcjonalna kandydata HORVU7Hr1G030250

Gen HORVU7Hr1G030250 (*Hvrh11*) ma długość 2654 par zasad i zawiera siedem eksonów kodujących białko (363 pz, 75 pz, 159 pz, 66 pz, 65 pz, 69 pz i 390 pz), które stanowią 1187 pz całej sekwencji (Ryc. 4.9) Gen koduje białko składające się z 396 aminokwasów. Analiza jego sekwencji białkowej pozwoliła na identyfikację domeny charakterystycznej dla czynników transkrypcyjnych z rodziny bHLH. Główna domena białek bHLH obejmuje około 50-60 aminokwasów i jest wysoce konserwowanym motywem, zbudowanym z dwóch amfipatycznych α -helis odseparowanych pętlą. Motywy α -helisy odpowiedzialne są za formowanie heterodimerów pomiędzy białkami bHLH, co jest warunkiem wstępnym do wiązania cząsteczek białek z DNA. W strukturze białek bHLH można wyróżnić domeny C- i N-terminalną. Koniec N-terminalny zaangażowany jest w kontakt z DNA. Wiele białek bHLH posiada charakterystyczną konfigurację aminokwasów (H-E-R His-Glu-Arg) w pozycjach 5, 9, i 13, które prawdopodobnie są zaangażowane w kontakt z kwasem nukleinowym (Heim i inni, 2003). Konserwowane pozycje zostały również znalezione w białku kodowanym przez gen HORVU7Hr1G030250. Ponadto, w białkowej sekwencji HORVU7Hr1G030250 zidentyfikowano dodatkową konserwowaną domenę LRL (Ryc. 4.9). Zgodnie doniesieniami literaturowymi, domeny te zostały opisane jako istotne dla procesu regulacji

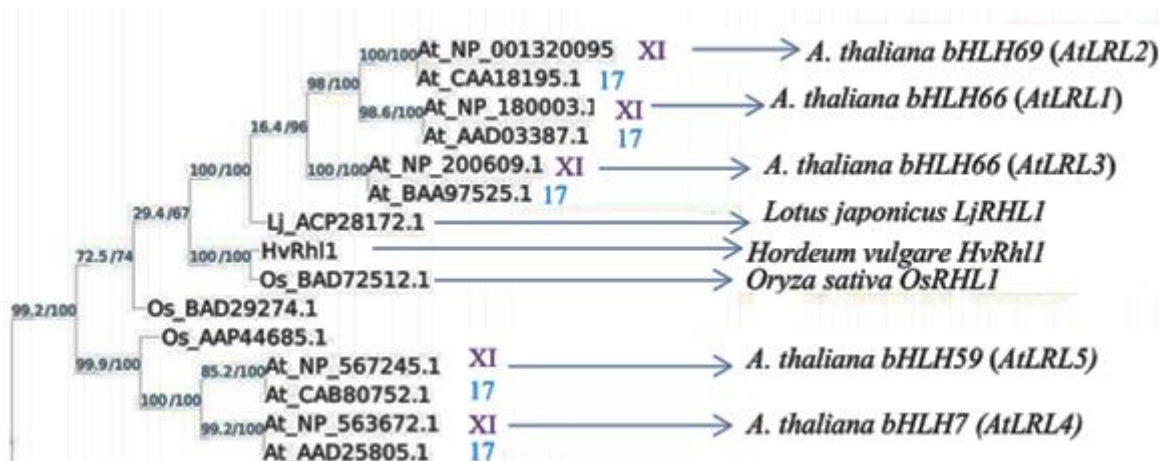
ekspresji genów przez białka bHLH, w związku z czym są ważne dla prawidłowego funkcjonowania tych białek (Heim i inni, 2003).



Rycina 4.9. Struktura genu HORVU7Hr1G030250 i schemat domen białka HORVU7Hr1G030250. Niebieskie pola i linie reprezentują odpowiednio eksony i introny. Część eksonu 2 i 4 oraz eksonu 3 koduje domenę bHLH. Część eksonu 7 koduje domenę LRL. L1 – motyw sekwencji box-like 5'-TAAATGT-3. N, C- odpowiednio region N i C terminalny białka.

Białko kodowane przez gen HORVU7Hr1G030250 wykazuje 83% identyczności sekwencji z białkiem kodowanym przez gen BRADI1G47350 u *B. distachyon* i 72% identyczności sekwencji z produktem genu OS06G01840000 u *O. sativa*. Ponadto wykazuje wysokie podobieństwo sekwencji do AtLRL1 (At2g24260), AtLRL2 (At4g30980), AtLRL3 (At5g58010) AtLRL4 (At1g03040) i AtLRL5 (At4g02590), które należą do dwóch grup antagonistycznie działających regulatorów rozoju włósników u *Arabidopsis* (Breuninger i inni, 2016). Białko bHLH kodowane przez gen *Hvrh11* jest najbardziej podobne do podrodziny bHLH XI *Arabidopsis*, zgodnie z klasyfikacją Heima i innych (2003), która odpowiada 17 podrodzynie z klasyfikacji Toledo-Ortiza i innych (2003) (Ryc. 4.10).

Dodatkowo, analiza sekwencji promotorowej genu HORVU7Hr1G030250 pozwoliła na znalezienie motywu oznaczonego L1 typu box-5'-TAAATGT-3 w regionie -332 do -325 pz przed eksonem pierwszym (Aneks 2, Ryc. 1 w pliku Aneks2.*docx). Ten typ motywu jest obecny w promotorach genów *Arabidopsis*: *At2g24260 AtLRL1* i *At4g30980 AtLRL2* i jest rozpoznawany przez czynnik transkrypcyjny GL2, biorący udział w wytwarzaniu wzoru epidermy (Lin i inni, 2015).

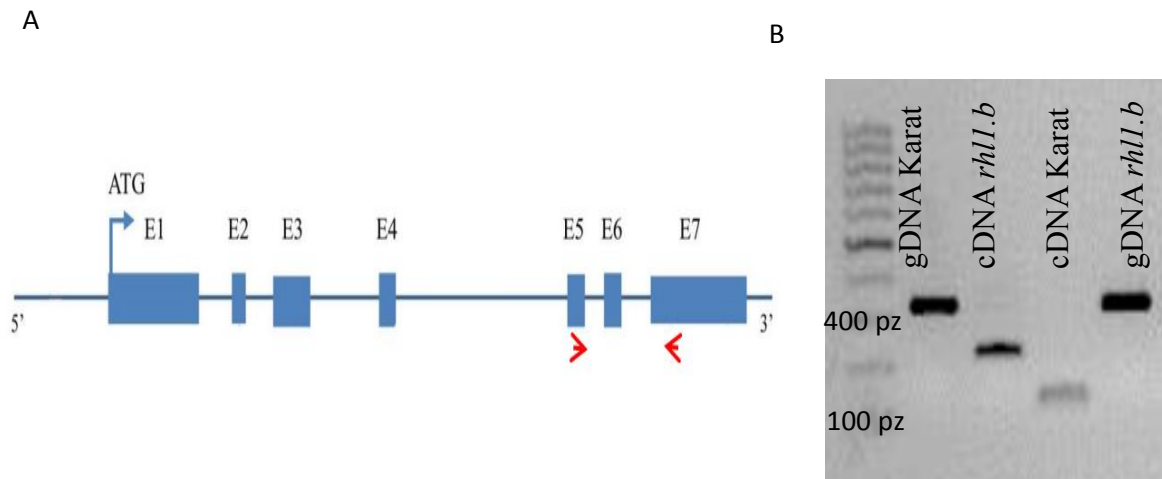


Ryc. 4.10. Drzewo filogenetyczne skonstruowane metodą największej wiarygodności przedstawiające fragment klastra obejmującego podrodzinę XI (17) białek bHLH. Białko bHLH kodowane przed gen HORVU7Hr1G030250 (Hvrh1) zostało zgrupowane w tej samej grupie, co pięć białek LRL Arabidopsis: AtLRL1, AtLRL2, AtLRL3, AtLRL4 i AtLRL5. Liczby znajdujące się po prawej stronie od identyfikatorów białek wskazują przynależność białka Arabidopsis do podrodziny XI według Heima i innych (2003) (fioletowy) lub podrodziny 17 wg. Toledo-Ortiz i innych (2003) (niebieski). Ocena istotności statystycznej drzewa opisana na węzłach poszczególnych kładów, obliczona na podstawie testów SH-aLRT support (%) / ultrafast bootstrap support (%) (UFboot). Procent poparcia SH-aLRT $\geq 80\%$ i UFboot $\geq 95\%$ pozwala przypisać otrzymanemu węzłowi duże prawdopodobieństwo. At - *Arabidopsis thaliana*, Os - *Oryza sativa*, Hv - *Hordeum vulgare*, Lt - *Lotus japonicus*.

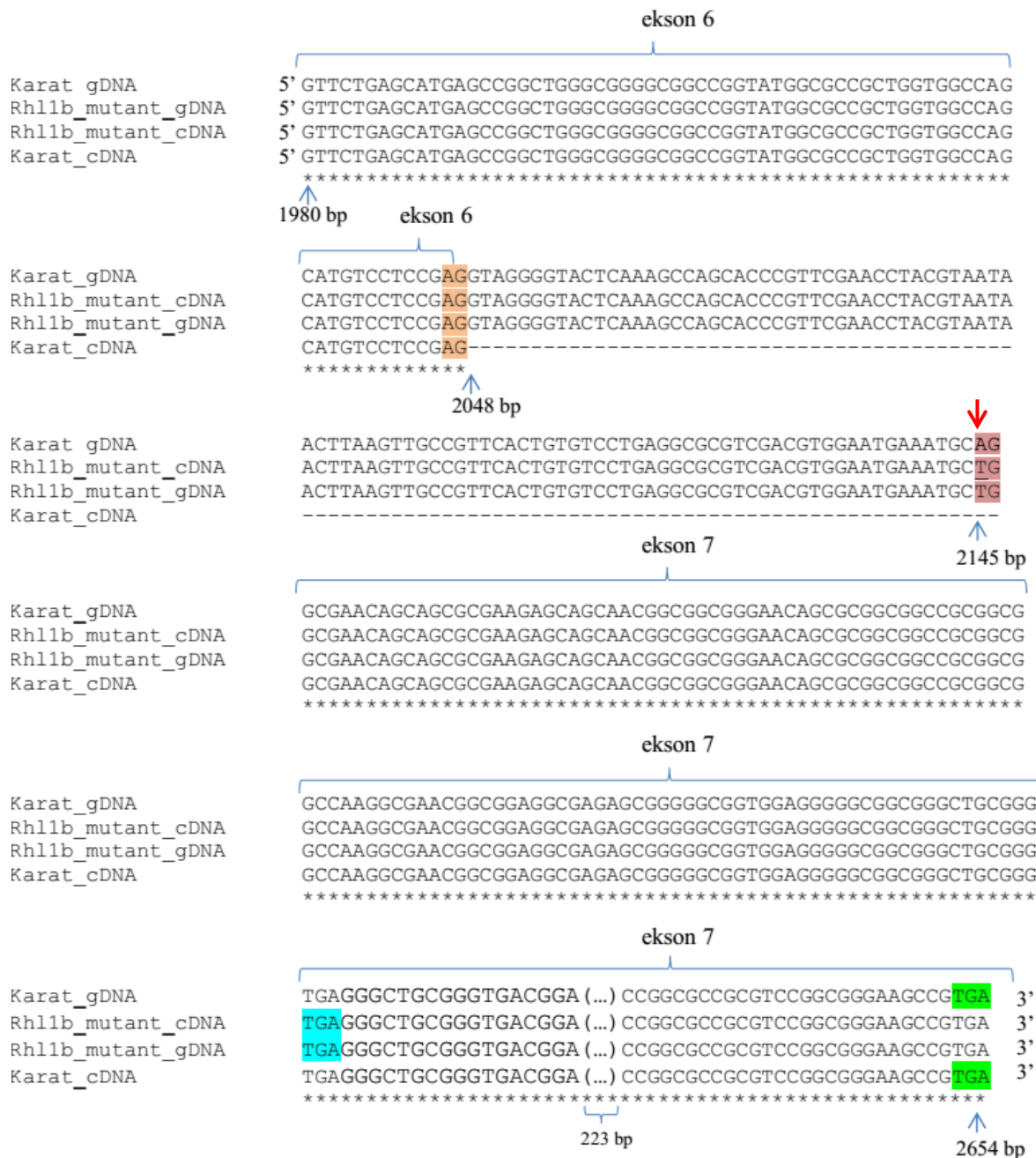
4.7.1. Analiza *in silico* miejsca mutacji i określenie jej potencjalnego wpływu na proces splicingu oraz strukturę syntetyzowanego białka.

Bioinformatyczna analiza wykazała, że zidentyfikowana mutacja jest zlokalizowana w miejscu opisanym jako konstytutywna sekwencja istotna dla procesu wycinania intronów. W wyniku transwersji A \rightarrow T prawdopodobnie dochodzi do utraty miejsca akceptorowego, co z kolei może wpływać na prawidłowe zajście procesu składania eksonów. Zatrzymanie ostatniego intronu w sekwencji mRNA u mutantu skutkuje zmianą w długość i sekwencji dojrzałego mRNA. W celu udowodnienia tego przewidywania, region obejmujący część piątego i siódmego eksonu genu bHLH został zamplifikowany przy wykorzystaniu jako matrycy genomowego DNA oraz cDNA uzyskanego z korzeni mutantu *rh11.b* oraz odmiany ‘Karat’ (Ryc. 4.11; A). U mutantu *rh11.b* zaobserwowano, że produkt PCR wytworzony z matrycy cDNA był dłuższy o 98 pz, w porównaniu do odmiany ‘Karat’, podczas gdy produkty uzyskane na matrycy genomowego DNA były identyczne u obu form (Ryc. 4.11; B). Wynik ten wskazuje, że mutacja rzeczywiście prowadzi do retencji ostatniego intronu, co zmienia strukturę mRNA bHLH u mutantu. Wynik potwierdzono poprzez sekwencjonowanie fragmentu genu HORVU7Hr1G030250

uzyskanego na matrycy genomowego DNA oraz cDNA, otrzymanego przez amplifikację z użyciem starterów zakotwiczonych w eksonie 1 oraz eksonie 7 badanego genu (Ryc. 4.12).



Rycina 4.11. Analiza wpływu mutacji na proces splicing. A) Struktura genu HORVU7Hr1G03025. Miejsca przyłączenia starterów zastosowanych podczas analizy oznaczono czerwonymi strzałkami. Niebieskie pola i linie reprezentują odpowiednio eksony i introny. B) Wizualizacja specyficznego produktu po reakcji PCR z użyciem starterów flankujących, obejmujących część piątego i siódmego eksonu sekwencji HORVU7Hr1G030250. Oczekiwane rozmiary produktów PCR to 328 pz dla gDNA mutantu Karat i *rh11.b*, 126 pz dla cDNA Karata i 223 pz dla cDNA mutantu *rh11.b*.



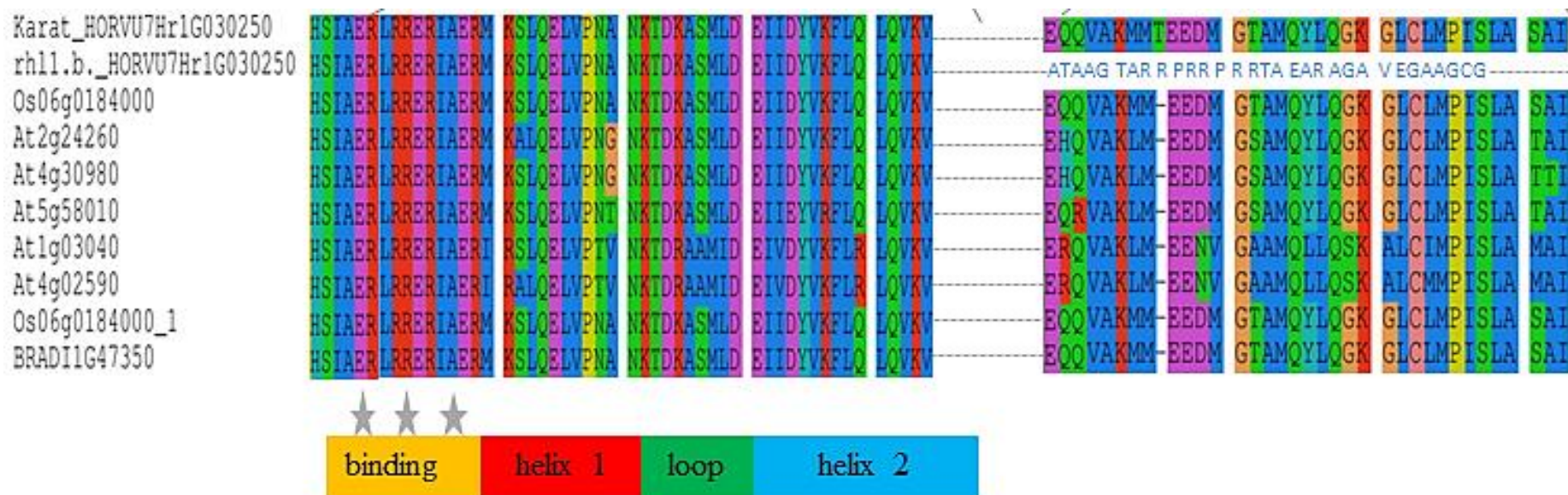
Rycina 4.12. Porównanie części sekwencji genomowego DNA oraz cDNA genu HORVU7Hr1G030250 obejmujących ekson 6, intron 6 i ekson 7 mutantu *rh11.b* i jego odmiany wyjściowej 'Karat'. Zmutowany allel zawiera pojedynczą zmianę pary zasad A→T (oznaczoną czerwoną strzałką) zlokalizowaną w miejscu akceptorowym wyróżnionym czerwonym kolorem. Miejsce donorowe oznaczono kolorem pomarańczowym. Niebieski kolor reprezentuje przedwczesny kodon STOP w sekwencji genu u mutantu. Kolor zielony wskazuje prawidłowy kodon STOP w genie odmiany 'Karat'. Linia przerywana przedstawia wycięty intron u odmiany 'Karat'.

Zatrzymanie intronu w dojrzałym mRNA może skutkować powstawaniem nieprawidłowego białka. Analiza *in silico* przeprowadzona za pomocą narzędzia do translacji w portalu ExPASy umożliwiła wykrycie możliwych otwartych ramek odczytu

dla sekwencji mRNA u mutantu *rh11.b* oraz jego formy wyjściowej ‘Karat’. Stwierdzono, że zidentyfikowana mutacja może powodować przesunięcie ramki odczytu prowadzące do nieprawidłowej syntezy 71 aminokwasów i powstania przedwczesnego kodonu STOP w pozycji 116 pz od początku siódmego eksonu w transkrypcie mutantu *rh11.b* (Ryc. 4.13). W rezultacie, przewidywane białko jest krótsze o 58 aminokwasów, ponadto nie ma prawidłowej sekwencji domeny LRL, która jest obecna w białku odmiany ‘Karat’ (Ryc. 4.14). Zmiana w strukturze białka bHLH może wpływać na jego aktywność i w konsekwencji uniemożliwiać tworzenie prawidłowego wzoru ryzodermy, prowadząc do braku włóśników u mutantu *rh11.b*.

Karat	1	MAGDGGGGGAQDDFFDQMLSTLPSAWGDLGAGGKSPWEIAAGAEDLGAFDESALLASRLR
<i>rh11_mutant</i>		MAGDGGGGGAQDDFFDQMLSTLPSAWGDLGAGGKSPWEIAAGAEDLGAFDESALLASRLR *****
Karat	63	QHIGGEKPVMLQLTDLQRQGLGEETGGTGFSPLPLFADRSPQSREEMDGGFKSPNGTGGD
<i>rh11_mutant</i>		QHIGGEKPVMLQLTDLQRQGLGEETGGTGFSPLPLFADRSPQSREEMDGGFKSPNGTGGD *****
Karat	125	HALFNGFGVHGGAAAVQPTFGQGGSMSGQSFGGGPAASGGTTAPASSGGGAAPPRQTRVRA
<i>rh11 mutant</i>		HALFNGFGVHGGAAAVQPTFGQGGSMSGQSFGGGPAASGGTTAPASSGGGAAPPRQTRVRA *****
		domena bHLH
Karat	186	RRGQATDPHSIAERLRRERIAERMKSLQELVPNANKTDKASMLDEIIDYVKFLQLQVKVLSM
<i>rh11_mutant</i>		RRGQATDPHSIAERLRRERIAERMKSLQELVPNANKTDKASMLDEIIDYVKFLQLQVKVLSM *****
Karat	248	SRLGGAAGMAPLVASMSSEANSSAKSSNGGNSAAAAAAKANGGEGSGGGGGGGLRVT
<i>rh11_mutant</i>		SRLGGAAGMAPLVASMSSEVGLKASTRSNLRNNLSCRSLCPEARRRGMKCWRTAARRA ***** * *
		domena LRL
Karat	307	EQQVAKMMEEDMGTTAMQYLOGKGLCLMPISLASAIS
<i>rh11_mutant</i>		ATAAGTARRPRRPRRTAEARAGAVEGAAGCG
Karat	348	AAALASANGGEDAAARPVKVDAGAASGGKP
<i>rh11_mutant</i>		

Rycina 4.13. Wyniki analizy *in silico* możliwego wpływu mutacji w genie HORVU7Hr1G030250 na syntetyzowane białko. Porównanie sekwencji białka u odmiany wyjściowej ‘Karat’ z białkiem mutantu *rh11.b*. Identyczne aminokwasy oznaczono gwiazdkami. Domeny bHLH i LRL są oznaczone odpowiednio kolorem zielonym i fioletowym.



Rycina 4.14. Wyniki analizy *in silico* możliwego wpływu mutacji w genie HORVU7Hr1G030250 na syntetyzowane białko. B) Porównanie domen bHLH i LRL genu HORVU7Hr1G030250 u odmiany ‘Karat’, mutanta *rh11.b* oraz homologicznych białek *A. thaliana*, *O. sativa* i *B. distachyon*. Przewidywana sekwencja białka mutanta *rh11.b* ma niepoprawną sekwencję aminokwasów (niebieskie litery) w regionie, który odpowiada domenie LRL w białku u odmiany ‘Karat’. Szare gwiazdy - konserwowane reszty aminokwasowe, które są ważne dla kontaktu białka z nukleotydami w DNA.

4.8. Weryfikacja ko-segregacji genu kandydackiego *Hvrh11* z fenotypem strefy włóśnikowej korzeni

W celu wstępnej weryfikacji czy gen kodujący białko bHLH może być odpowiedzialny za bezwłóśnikowy fenotyp mutantu, wykonano analizę segregacji alleli tego genu w populacji mapującej, stosując dwa podejścia. Pierwsza analiza została oparta na procedurze EcoTILLING ukierunkowanej bezpośrednio na miejsce mutacji A→T w genie kandydującym. Procedura ta została przeprowadzona dla 96 osobników pokolenia F₂ o bezwłóśnikowym fenotypie z populacji mapującej *rh11.b* x ‘Morex’. Dodatkowo spośród 96 analizowanych osobników wybrano losowo sześć roślin, których produkty reakcji poddano sekwencjonowaniu, celem sprawdzenia poprawności analiz przy użyciu procedury EcoTILLING. Stwierdzono pełną ko-segregację fenotypu i homozygotycznego stan mutacji (Ryc. 4.15).

```
KARAT_F      GCGTCGACGTGGAATGAAATGCAAGGCCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGGCGGG
KARAT_R      GCGTCGACGTGGAATGAAATGCAAGGCCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGGCGGG
1F           GCGTCGACGTGGAATGAAATGCTGGCGGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGGCGGG
2F           GCGTCGACGTGGAATGAAATGCTGGCGGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGGCGGG
3F           GCGTCGACGTGGAATGAAATGCTGGCGGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGGCGGG
4F           GCGTCGACGTGGAATGAAATGCTGGCGGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGGCGGG
5F           GCGTCGACGTGGAATGAAATGCTGGCGGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGGCGGG
6F           GCGTCGACGTGGAATGAAATGCTGGCGGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGGCGGG
1R           GCGTCGACGTGGAATGAAATGCTGGCGGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGGCGGG
2R           GCGTCGACGTGGAATGAAATGCTGGCGGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGGCGGG
3R           GCGTCGACGTGGAATGAAATGCTGGCGGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGGCGGG
4R           GCGTCGACGTGGAATGAAATGCTGGCGGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGGCGGG
5R           GCGTCGACGTGGAATGAAATGCTGGCGGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGGCGGG
6R           GCGTCGACGTGGAATGAAATGCTGGCGGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGGCGGG
*****
```

Ryciana 4.15. Porównanie sekwencji pomiędzy odmianą ‘Karat’, a losowo wybranymi roślinami o fenotypie bezwłóśnikowym (1 - 6) dla fragmentu genu HORVU7Hr1G030250 obejmującego mutację A→T, dla wszystkich osobników potwierdzono stan homozygotyczny mutacji. Pozycja mutacji oznaczona czerwoną ramką.

Ponadto, przeprowadzono sekwencjonowanie fragmentu obejmującego mutację A→T dla siedmiu wcześniej wytypowanych podwójnych rekombinantów między genem *rh11* a markerami SSR. Sekwencjonowanie potwierdziło obecność mutacji w stanie homozygotycznym dla wszystkich rekombinantów (Ryc. 4.16).

```

KARAT_F      GCGTTCGACGTGGAATGAAATGCAGCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGC GGG
KARAT_R      GCGTTCGACGTGGAATGAAATGCAGCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGC GGG
1REK_F       GCGTTCGACGTGGAATGAAATGCTGCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGC GGG
2REK_F       GCGTTCGACGTGGAATGAAATGCTGCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGC GGG
3REK_F       GCGTTCGACGTGGAATGAAATGCTGCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGC GGG
4REK_F       GCGTTCGACGTGGAATGAAATGCTGCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGC GGG
5REK_F       GCGTTCGACGTGGAATGAAATGCTGCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGC GGG
6REK_F       GCGTTCGACGTGGAATGAAATGCTGCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGC GGG
1REK_R       GCGTTCGACGTGGAATGAAATGCTGCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGC GGG
2REK_R       GCGTTCGACGTGGAATGAAATGCTGCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGC GGG
3REK_R       GCGTTCGACGTGGAATGAAATGCTGCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGC GGG
4REK_R       GCGTTCGACGTGGAATGAAATGCTGCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGC GGG
5REK_R       GCGTTCGACGTGGAATGAAATGCTGCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGC GGG
6REK_R       GCGTTCGACGTGGAATGAAATGCTGCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGC GGG
7REK_R       GCGTTCGACGTGGAATGAAATGCTGCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGC GGG
*****

```

Ryciana 4.16. Porównanie sekwencji pomiędzy odmianą ‘Karat’, a siedmioma podwójnymi rekombinantami (1 - 7) dla fragmentu genu HORVU7Hr1G030250 obejmującego mutację A→T, dla wszystkich osobników potwierdzono stan homozygotyczny mutacji. Pozycja mutacji oznaczona czerwoną ramką.

W drugim podejściu analizie poddano polimorfizm In/Del, zidentyfikowany pomiędzy mutantem *rh11.b* a odmianą ‘Morex’. Polimorficzne miejsce znajduje się w czwartym intronie genu kandydackiego *Hvrh11*, 728 pz powyżej mutacji, a różnica w długości pomiędzy produktem PCR uzyskiwanym na matrycach DNA genotypów rodzicielskich wynosi 5 nukleotydów. Segregację tego polimorfizmu zanalizowano w 1472 roślinach pokolenia F₂ wykorzystywanych wcześniej w tworzeniu mapy genetycznej (Tab. 4.13). Wszystkie osobniki charakteryzujące się zmutowanym fenotypem wykazywały ten sam homozygotyczny genotyp dla miejsca markera In/Del, tak jak u mutantu *rh11.b*, podczas gdy osobniki z prawidłowo rozwijającymi się włośnikami były heterozygotyczne lub homozygotyczne jako odmiana ‘Morex’. Uzyskana segregacja była godna z oczekiwanym stosunkiem rozszczepień 1:2:1, potwierdzonym przez wartość 2,571 w teście χ^2 1: 2: 1.

Tabela 4.13. Analiza segregacji markera In/Del w intronie genu kandydackiego HORVU7Hr1G030250 w populacji 1472 roślin pokolejnia F₂ *rh11.b* x ‘Morex’.

Locus	Klasa genotypowa					χ^2
	a	h	b	c	x	
<i>rh11</i>	393	0	0	1079	0	0,99
HORVU7Hr1G030250	393	710	364	0	0	2,57

a - homozygota jak mutant *rh11.b*; b - homozygota jako odmiana ‘Morex’; c - genotyp inny niż "a"; h - heterozygota; x - brakujące dane

Oprócz powyższych analiz, przeprowadzono także genotypowanie pozostałych czterech genów kandydackich z wytypowanego przedziału na mapie fizycznej. W tym celu wybrano wszystkie bezwłośnikowe osobniki pokolenia F₂, wykazujące co najmniej jedno

zdarzenie rekombinacji między genem *Hvrh11* i markerami MLOC_35776 lub MLOC_4840, które flankują gen kandydacki. Ogółem znaleziono 21 takich osobników. Genotypowanie oparto o wybrane zmiany SNP lub In/Del zidentyfikowane między mutantem *rh11.b* a odmianą 'Morex' w każdym z genów kandydackich. Zidentyfikowano dwa osobniki F₂ charakteryzujące się zdarzeniami podwójnej rekombinacji między locus *rh11* i genami znajdującymi się po jego obu stronach w najbliższej odległości w przedziale fizycznym, tj. genem HORVU7Hr1G030270 (kodującym czynnik transkrypcyjny z rodziny białek Krüppel) i HORVU7Hr1G030220 (kodującym białko z domeną RING (Ryc. 4.17). Dodatkowo, cztery inne rośliny były pojedynczymi rekombinantami między genami HORVU7Hr1G030270 i *rh11*. W przypadku dwóch innych loci: HORVU7Hr1G030280, który koduje rybosomalne białko S34 i HORVU7Hr1G030290, odpowiedzialnym za polarną lokalizację białek podczas asymetrycznego podziału komórki, zaobserwowano identyczny wzór segregacji dla wszystkich 21 osobników, jak w przypadku flankującego markera MLOC_35776 (HORVU7Hr1G030300) (Ryc. 4.17). Obserwacja ta pokazuje, że wszystkie te loci znajdują się poza punktami rekombinacji zlokalizowanymi z obu stron genu *rh11*. Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe analizy, gen HORVU7Hr1G030250 kodujący przypuszczalny czynnik transkrypcyjny bHLH jest najlepszym i najsilniejszym kandydatem odpowiedzialnym za brak włóśników u mutantu *rh11.b*.

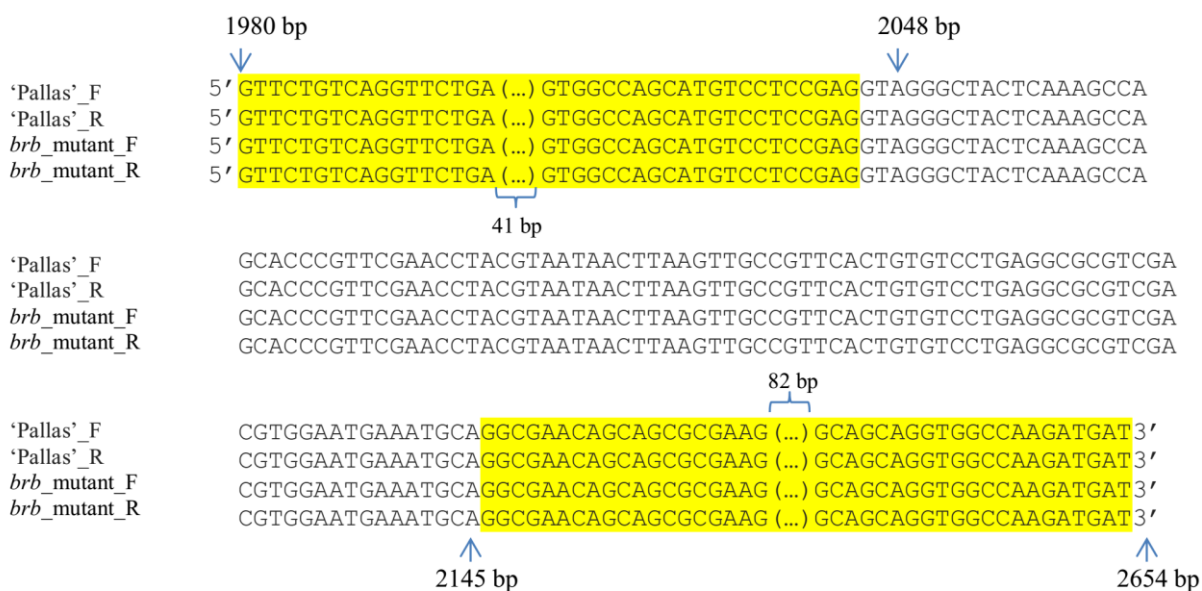
Rekombinanty F₂ pomiędzy flankującymi loci HORVU7Hr1G030210 i/lub
HORVU7Hr1G030300, a genem *rhl1*.

HORVU ID		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
10.3	MLOC_4840 (3_0752)	h	h	h	h	h	a	a	a	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
	HORVU7Hr1G030210	h	h	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	HORVU7Hr1G030220	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	<i>rhl1</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	HORVU7Hr1G030250	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	HORVU7Hr1G030270	h	h	h	h	h	h	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	HORVU7Hr1G030280	a	h	h	h	h	h	h	h	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	HORVU7Hr1G030290	a	h	h	h	h	h	h	h	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
14.0	MLOC_35776	a	h	h	h	h	h	h	h	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	(MLOC_35776) HORVU7Hr1G030300	a	h	h	h	h	h	h	h	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

Rycina 4.17. Wyniki genotypowania podwójnych i pojedynczych rekombinantów F₂ zidentyfikowanych dla rejonu genu *rhl1* otoczonego markerami MLOC_4840 i MLOC_35776 (zaznaczonymi na zielono). Genotypowanie było wykonalne dla wszystkich genów zlokalizowanych w fizycznym interwale pomiędzy flankującymi markerami. h - heterozygota, a – homozygota, jak mutant *rhl1.b*. Gen kandydacki HORVU7Hr1G030250 (*Hvrhl1*) zaznaczono na żółto.

4.9. Analiza sekwencji genu HORVU7Hr1G030250 u bezwłośnikowego mutantu *brb*

We wcześniejszych pracach Katedry Genetyki UŚ wykazano, że geny warunkujące bezwłośnikowy fenotyp spontanicznego mutantu *brb*, pochodzącego z odmiany ‘Pallas’ oraz mutantu *rhl1*, są alleliczne (Chmielewska, 2014). Dlatego też genomową sekwencję genu HORVU7Hr1G030250 analizowano również u mutantu *brb* oraz odmiany ‘Pallas’, lecz nie wykryto mutacji w formie *brb* w żadnym z eksonów ani intronów genu HORVU7Hr1G030250 (Ryc. 4.18). Z tego powodu analiza sekwencji została rozszerzona na 4474 pz powyżej i 1882 pz poniżej regionu CDS genu, ale ponownie ich analiza nie wykazała żadnych różnic między mutantem *brb* i odmianą ‘Pallas’ (Aneks 2, Ryc. 2 w pliku Aneks2.docx).



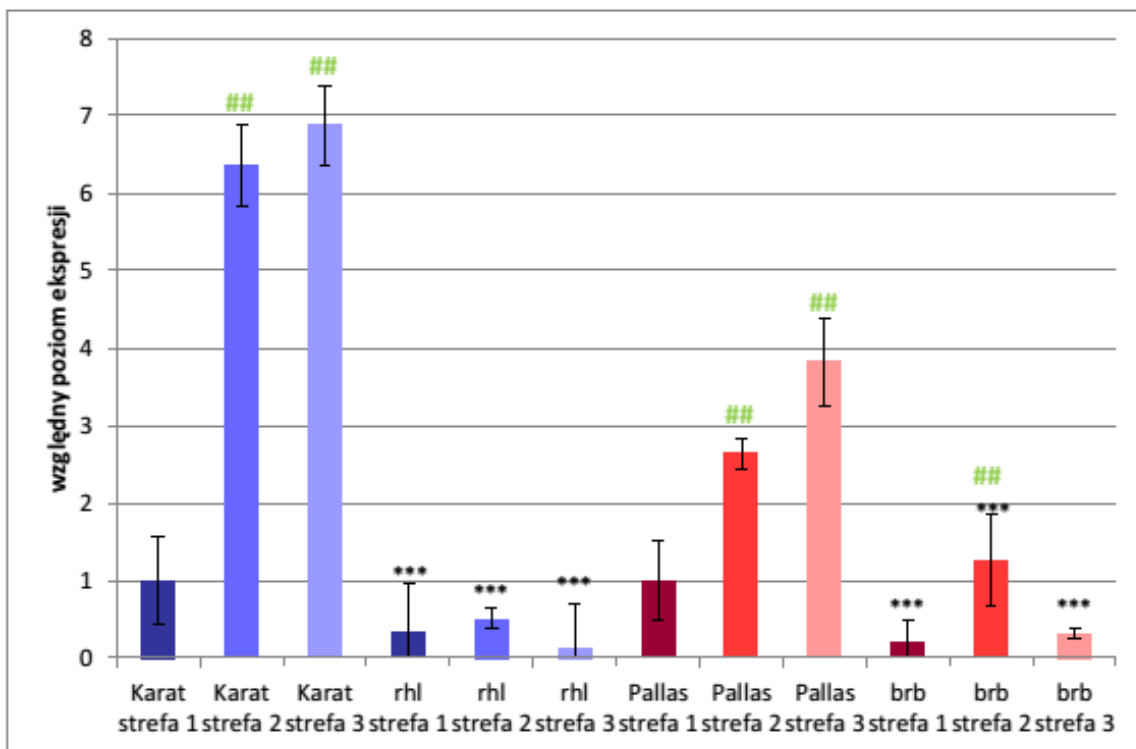
Rycina 4.18. Porównanie fragmentu sekwencji genu HORVU7Hr1G030250 dla mutantu *brb* i jego odmiany wyjściowej ‘Pallas’. Żółty kolor reprezentuje eksony szósty i siódmy. Pełna analizowana sekwencję genu HORVU7Hr1G030250 wraz z badanym regionem powyżej i poniżej CDS genu znajduje się w Aneksie 2, (Ryc. 2 w pliku Aneks2.docx).

Ze względu na brak zidentyfikowanej mutacji w genie HORVU7Hr1G030250 u mutantu *brb*, sekwencjonowaniu poddano pozostałe cztery geny, zlokalizowane w rejonie wyznaczonym przez markery flankujące locus *rhl1*. Podobnie jak w przypadku genu HORVU7Hr1G030250, sekwencje wszystkich pozostałych genów były identyczne między mutantem *brb* i odmianą ‘Pallas’ (Aneks 2, Ryc. 3 w pliku Aneks2.docx).

4.10. Analiza ekspresji potencjalnego genu kandydackiego HORVU7Hr1G030250 w trzech strefach korzenia

W celu próby weryfikacji możliwego udziału genu HORVU7Hr1G030250 w procesie tworzenia włóśników przeprowadzono analizę jego ekspresji w trzech sekcjach korzenia. Każda sekcja obejmowała 1 mm odpowiedniego segmentu korzenia tzn: strefy wierzchołkowej korzenia (1), strefy elongacyjnej ze strefą różnicowania (2) i strefy włóśnikowej (3). W przypadku odmiany 'Karat' najniższy poziom ekspresji genu HORVU7Hr1G030250 zaobserwowano w strefie wierzchołkowej korzenia. Poziom ekspresji znacznie zwiększył się ($P \leq 0,001$) w strefie elongacji i różnicowania i pozostał na podobnie wysokim poziomie w strefie włóśnikowej (Ryc. 4.19). Obserwacja ta wskazuje, że istnieje związek między ekspresją genu kandydackiego, a tworzeniem się włóśników. U mutantu *rh11.b* poziom ekspresji genu HORVU7Hr1G030250 był 3-krotnie, 12-krotnie i 50-krotnie niższy odpowiednio w strefach 1, 2 i 3, w porównaniu z odpowiednimi strefami odmiany 'Karat'. Ponadto, gdy ekspresję genu-kandydata porównywano wyłącznie pomiędzy trzema strefami korzeni mutantu *rh11.b*, nie zauważono różnic statystycznych między nimi ($P > 0,05$, Ryc. 4.19).

Przeprowadzono również analizę poziomu ekspresji genu kandydackiego w trzech strefach korzenia dla mutantu *brb* oraz jego odmiany wyjściowej. W odmianie 'Pallas' zaobserwowano podobny wzór ekspresji, jak odmiany 'Karat', chociaż poziom ekspresji był niższy w genotypie 'Pallas'. W przypadku mutantu *brb* ekspresja genu kandydackiego była znacznie niższa niż w jego odmianie wyjściowej, a w pierwszej i trzeciej strefie korzenia była na podobnym poziomie jak u mutantu *rh11.b*. Statystycznie istotny ($P \leq 0,01$) wzrost ekspresji genu zaobserwowano jedynie w strefie wydłużenia w porównaniu ze strefą wierzchołkową i włóśnikową korzeni, lecz w każdej strefie ekspresja genu HORVU7Hr1G030250 u mutantu *brb* była istotnie niższa niż w odmianie wyjściowej 'Pallas' (Ryc. 4.19).

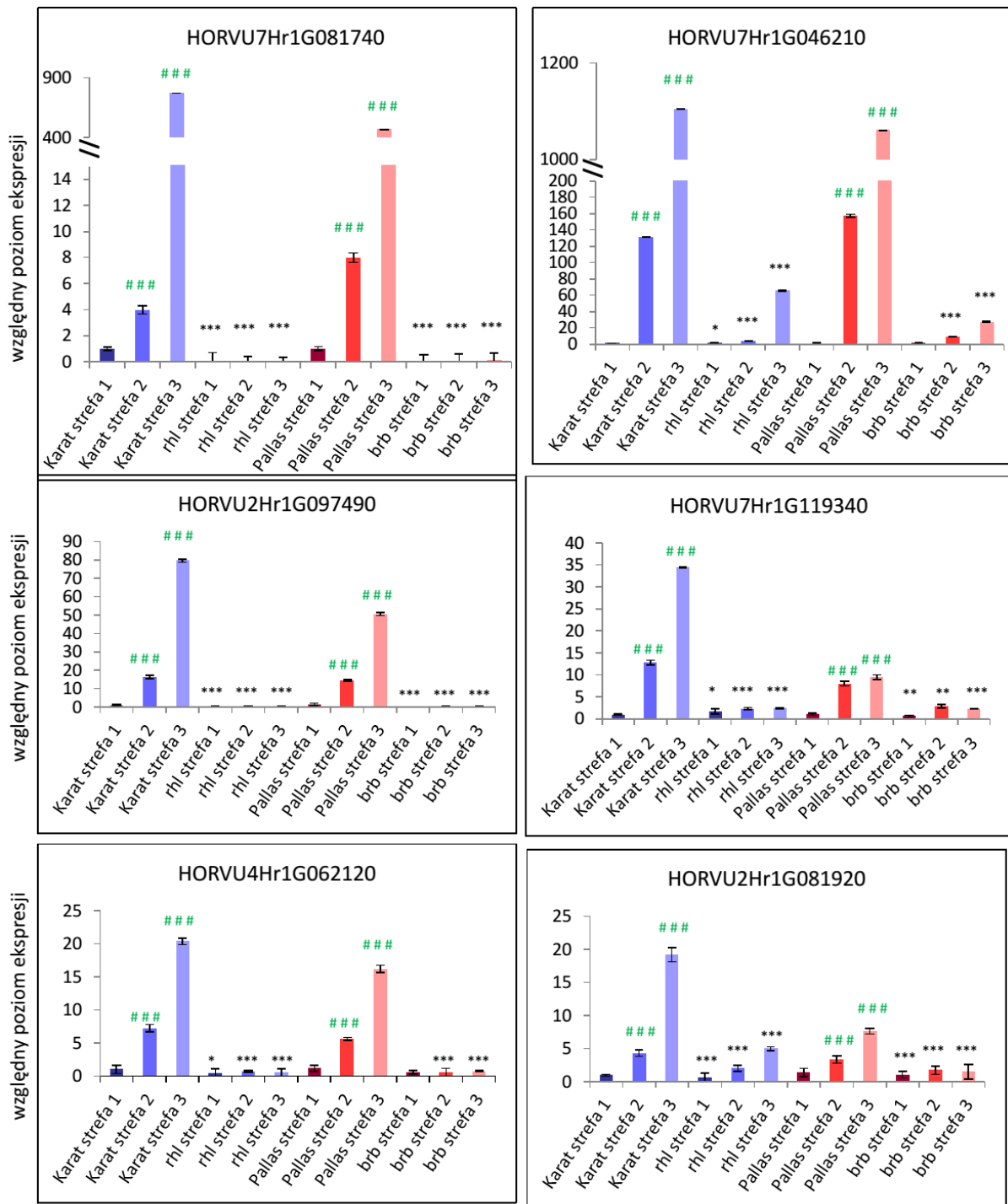


Rycina 4.19. Względny poziom ekspresji kandydackiego genu HORVU7Hr1G030250 w trzech strefach korzenia oznaczony dla odmian ‘Karat’ i ‘Pallas’ oraz mutantów *rh1.b* i *brb*. Poziom ekspresji genów dla każdej strefy korzeniowej określonego genotypu (Pallas, Karat, *rh1.b*, *brb*) został znormalizowany względem poziomu ekspresji w strefie apikalnej w odmianie Karat gdzie przyjęto wartość równą 1. Czarne gwiazdki wskazują na istotne różnice między mutantami i ich odmianami wyjściowymi w odniesieniu do odpowiednich stref korzeniowych. Zielone krzyżyki wskazują na istotne różnice między strefą 1 a strefą 2 lub 3 w obrębie pojedynczego genotypu. *** $P \leq 0,001$; ** $P \leq 0,01$; * $P > 0,05$. #### $P \leq 0,001$; ## $P \leq 0,01$; # $P > 0,05$.

4.11. Analiza ekspresji wybranych genów potencjalnie zaangażowanych w inicjację procesu morfogenezy włóśników u jęczmienia

Ze względu na fakt, że w toku prowadzonych prac uzyskano kontrowersyjny wynik: brak mutacji w genie kandydackim między mutantem *brb* a odmianą ‘Pallas’, przy jednoczesnym wyniku wskazującym na alleliczność mutantów *brb* i *rh1.b*, postanowiono sprawdzić, jaki jest poziom ekspresji wybranych genów będących prawdopodobnymi bezpośrednimi lub pośrednimi genami docelowymi dla czynnika transkrypcyjnego bHLH, kodowanego przez gen HORVU7Hr1G030250 niosący mutację u formy *rh1.b*. W tym celu wytypowano geny opisane jako potencjalnie zaangażowane w proces rozwoju włóśników korzeniowych u jęczmienia na podstawie globalnej analizy transkryptomu mutantu *rh1.a* i jego formy wyjściowej ‘Karat’ (Kwaśniewski i inni, 2010), (Metody, Tab. 3.1).

Profil ekspresji analizowanych genów był zbliżony u obu odmian tzn. ‘Karat’ i ‘Pallas’ (Ryc. 4.20). Najniższy poziom ekspresji wszystkich genów zaobserwowano w strefie wierzchołkowej korzenia. Poziom ten znacznie zwiększył się w strefie elongacji i różnicowania oraz w strefie włóśnikowej. Zaobserwowano, że w przypadku obu mutantów *rh11.b* i *brb* poziom ekspresji wszystkich analizowanych genów był istotnie niższy odpowiednio w strefach 1, 2 i 3, w porównaniu z odpowiednimi strefami ich odmian wyjściowych. Co istotne wzór ekspresji badanych genów u mutantu *brb* był zbliżony do obserwowanego u formy *rh11.b* (Ryc. 4.20).



Rycina 4.20. Względny poziom ekspresji genów potencjalnie zaangażowanych w rozwój włóśników korzeniowych w trzech strefach korzeni oznaczony dla odmian 'Karat' i 'Pallas' oraz mutantów *rh1.b* i *brb*. Poziom ekspresji genów dla każdej strefy korzeniowej określonego genotypu (Pallas, Karat, *rh1.b*, *brb*) został znormalizowany względem poziomu ekspresji w strefie apikalnej w odmianie Karat gdzie przyjęto wartość równą 1. Czarne gwiazdki wskazują na istotne różnice między mutantami i ich odmianami wyjściowymi w odniesieniu do odpowiednich stref korzeniowych. Zielone krzyżyki wskazują na istotne różnice między strefą 1 a strefą 2 lub 3 w obrębie pojedynczego genotypu. *** $P \leq 0,001$; ** $P \leq 0,01$; * $P > 0,05$. #### $P \leq 0,001$; ## $P \leq 0,01$; # $P > 0,05$.

5. Dyskusja

5.1. Konstrukcja mapy genetycznej odcinka chromosomu 7HS, zawierającego gen *rh11*

Klonowanie w oparciu o mapę pozostaje jednym z głównych narzędzi genetycznych pozwalających scharakteryzować funkcje genów, niemniej jednak wymaga dysponowania wysokorozdzielczą mapą genetyczną, wysyconą markerami co jest kluczowe dla określenia fizycznej lokalizacji docelowego regionu chromosomowego i w konsekwencji dla pomyślnej izolacji genu (Tamura i inni, 2014; Wang i inni, 2015; Huang i inni, 2018; Guo i inni, 2017). W niniejszej pracy zastosowano tę strategię do sklonowania genu *rh11* u *H. vulgare*.

Przeprowadzona analiza pozwoliła na zmapowanie badanego genu w otoczeniu dwóch markerów flankujących, wyznaczających interwał, który na mapie genetycznej miał długość 3,7 cM, co odpowiadało 577 kpz na mapie fizycznej. Oznacza to, że 1 cM odpowiadał ok. 156 kpz. Gen *rh11* zlokalizowany jest w dystalnym regionie chromosomu 7HS. Inne badania prowadzone dla dystalnej części ramienia chromosomu 7HS, wskazywały na podobny rząd wielkości dla relacji między odległością genetyczną a fizyczną dla tego odcinka chromosomu, wynoszący ok. 100 kpz dla 1 cM odległości genetycznej (Kunzel i inni, 2000). Wartość ta została obliczona na podstawie odległości genetycznej wynoszącej 39,3 cM pomiędzy dwoma markerami cMWG703 i MWG836, które na mapie fizyczne oddalone są od siebie o 4 Mpz (Kunzel i inni, 2000).

Sukces klonowania w oparciu o mapę zależy od lokalizacji genu, gdyż precyzyjne wykrycie zdarzeń rekombinacyjnych jest łatwiejsze dla rejonów charakteryzujących się dużą częstotliwością zjawiska crossing-over. Sekwencjonowanie genomu jęczmienia wykazało, że 49% wszystkich otrzymanych kontigów może być przypisanych do rejonów o obniżonej częstości rekombinacji, a rejonny te zawierają około 22% genów jęczmienia (Mayer i inni, 2012). Nierówny rozkład częstotliwości rekombinacji wzdłuż chromosomu jako główny powód nieliniowego przełożenia odległości genetycznych na odległości fizyczne, opisał m.in. Bustamante i współpracownicy (2017) analizując bardziej szczegółowo chromosom 3H jęczmienia. W pracy zwrócono uwagę na to, jak długie odległości genetyczne w rejonach subterminalnych chromosomu przekładają się na krótkie fizyczne odległości, potwierdzając, że zdarzenia rekombinacji występują częściej w dystalnych regionach chromosomu 3H. Zupełnie inna sytuacja ma miejsce wokół centromeru, gdzie dystans genetyczny przekłada się na dłuższą fizyczną odległość, odzwierciedlającą istnienie tzw. zimnych punkty rekombinacji (Bustamante i inni, 2017). Jako przykład może posłużyć rejon zawierający gen odporności na wirusa żółtej mozaiki *rym4/5*, w którym stosunek odległości

fizycznej do genetycznej mieścił się w przedziale od 0,8 do 30 Mpz/cM, pomiędzy punktami wyznaczonymi przez poszczególne markery zlokalizowane w obrębie kontigu obejmującego gen *rym4/5* (Stein i inni, 2005). Interesujący przykład omawiany jest również w badaniu nad mapowaniem genu *HvLax-a*, który kontroluje długość kłosa u jęczmienia (Jost i inni, 2017). W pierwszych etapach analizy, pomimo uzyskania niewielkiego przedziału genetycznego na mapie wokół badanego genu tzn. 0,2 cM, okazało się, że jest on związany z dużym interwałem fizycznym, gdzie przewidywano obecność minimum 200 genów kandydackich. Autorzy postulują, że ostatecznie wyizolowany gen *HvLax-a* zlokalizowany jest w regionie o silnie tłumionej częstotliwości rekombinacji. Wynik uzyskany w prezentowanej pracy reprezentuje zatem przykład przeciwny, wskazujący na położenie genu *rh11* w obszarze chromosomu o relatywnie wysokiej częstości rekombinacji, co znacznie ułatwiło przeprowadzenie mapowania i typowania najbardziej prawdopodobnego kandydata odpowiedzialnego za bezwłosnikowy fenotyp mutantu. Z powodu napotykanym trudności związanych z lokalizacją genu, większość sklonowanych do tej pory genów u jęczmienia znajduje się w dystalnych obszarach chromosomów. Przykładem może być wcześniej wspomniany gen *rym4/5*, bądź gen *Cly1* kodujący czynnik transkrypcyjny z miejscem wiążącym microRNA oraz gen *mlo* warunkujący odporność na *Erysiphe graminis* (Ariyadasa i inni, 2014). Podobnie jak *rh11* zidentyfikowany w niniejszej pracy wymienione geny znajdują się w dystalnych obszarach chromosomów.

W prezentowanej pracy do budowy mapy użyto 1472 osobniki pokolenia F₂ lecz stanowiły one losowo wybrana subpopulacje populacji obejmującej 4952 roślin F₂. Zastosowanie licznej populacji w pierwszym etapie procedury zwiększyło szanse na detekcję większej liczby zdarzeń rekombinacyjnych. Z tego powodu, pomimo stosunkowo dużego interwału genetycznego pomiędzy markerami flankującymi gen *rh11* (3,7 cM), możliwe było bezpośrednie przejście z mapy genetycznej na mapę fizyczną genomu jęczmienia. Wielkość populacji mapującej, niezbędnej do przeprowadzenia klonowania pozycyjnego, jest silnie zależna od genetycznej i fizycznej rozdzielczości, skorelowanej z częstotliwością rekombinacji (Stein i Graner, 2004). Yuo (2012) i współpracownicy użyli 1512 roślin F₂ do izolacji genu *lks2* u jęczmienia. Najbliższy marker został zmapowany w odległości 0,27 cM od *lks2*, a otrzymany interwał korespondował z 613 kpz na mapie fizycznej. Inna populacja mapująca użyta do klonowania genu *Rpg1* obejmowała 3473 rośliny pokolenia F₂, a średnia odległość między markerami wynosiła jedynie 0,02 cM i odpowiadała 110 kpz (Brueggeman i inni, 2002). Qin i współpracownicy (2015) zmapowali gen *HvSGRA* stosując 693 osobniki pokolenia F₂ uzyskując interwał 0,4 cM, z kolei Gill i współpracownicy (2016) zawęzili

region dla mapowania genu odporności na *Puccinia graminis Rpg1* do 5 cM na podstawie jedynie 100 osobników F₂. Precyzyjne wykrycie zdarzeń rekombinacyjnych pomiędzy mapowanymi loci jest znacznie łatwiejsze dla regionów o dużej częstotliwości zjawiska crossing-over, dlatego możliwe jest stworzenie mapy genetycznej o wysokiej rozdzielczości również w oparciu o mniej liczne populacje.

W pracy wykorzystano populację pokolenia F₂ *rh11.b* x 'Morex', gdyż populacja F₂ jest relatywnie łatwa do uzyskania, a jej wyprowadzenie wiąże się z mniejszym nakładem środków i czasu, niż w przypadku populacji podwojonych haploidów lub linii RIL. Podstawową wadą populacji pokolenia F₂ jest możliwość tylko jednokrotnego jej wykorzystania, z powodu wysokiej heterozygotyczności w kolejnych pokoleniach. Potomstwo heterozygotycznych osobników populacji segreguje, a więc kolejne pokolenia nie są genetycznie identyczne w odniesieniu do populacji wyjściowej. Pomimo tej wady, ze względu na prostotę uzyskiwania licznych pokoleń F₂, ten typ populacji jest bardzo często stosowany zamiarów pracach zmierzających do klonowania genów w oparciu o mapę (Collard i inni, 2005).

W niniejszej pracy dane uzyskane z opublikowanych map genetycznych, porównane z wirtualnie uporządkowaną mapą genetyczną jęczmienia Genome Zipper (Mayer i inni, 2012) oraz informacje pochodzące bazy Ensembl Plants, dostarczyły niezbędnych źródeł do eksploracji nowych markerów, które znajdują się w docelowym regionie. Dodatkowo w tym badaniu opublikowana fizyczna mapa genomu jęczmienia nie tylko była źródłem sekwencji markerów, ale również pozwoliła zakotwiczyć markery flankujące locus *rh11* (MLOC_35776 i MLOC_4840) na mapie fizycznej, co umożliwiło wybór pięciu potencjalnych genów zlokalizowanych w docelowym przedziale z pominięciem dodatkowych etapów „chodzenia po chromosomie” i sekwencjonowania klonów BAC. Bazy te, wykorzystywano także w innych analizach ukierunkowanych na izolację genów jęczmienia. Przykładowo baza Genome Zipper stanowiła źródło markerów molekularnych do mapowania genów *H. vulgare* m.in. takich jak gen *dsp.ar* oraz *Vrs4* wpływających na morfologię kłosa (Shahinnia i inni, 2012; Koppolu i inni, 2013), oraz genu *rym11* warunkującego odporność na wirusa mozaiki (Lupken i inni, 2013). Z kolei baza Ensembl Plants jest powszechnie wykorzystywana w analizie sekwencji kandydackich w pracach nad izolacją genów (Singh i inni, 2017; Yoshioka i inni, 2017; Oiestad i inni, 2017).

W prezentowanej pracy spośród wszystkich analizowanych markerów, które opracowano w celu dokładnego mapowania regionu genu *rh11*, 13 markerów wykazało

prawidłową segregację. Tylko jeden marker, MLOC_61391, ujawnił odchylenia od prawidłowej segregacji. Odchylenie od spodziewanej segregacji, definiowane jest jako odchylenie obserwowanych częstości genotypowych od ich oczekiwanych wartości. Zaburzona segregacja mapowanych loci może wpływać na nieprawidłowe tworzenie grupy sprzężeń (Lu i inni, 2002). Zaburzenie segregacji jest powszechnym zjawiskiem obserwowanym w populacjach mapujących wyprowadzonych z krzyżówek zróżnicowanych genetycznie form rodzicielskich (Zhao i inni, 2006; Wu i inni, 2010; Baumbach i inni, 2012; Kubo i inni, 2016; Gradner i inni, 2016). Udział loci wykazujących istotne zaburzenia w segregacji różni się znacznie w zależności od gatunku, rodzaju populacji, stopienia pokrewieństwa form rodzicielskich wybranych do krzyżówki oraz epigenetycznych modyfikacji chromatyny (Xian-Liang i inni, 2006; Li i inni, 2010; Liu i inni, 2010; Habu i inni, 2015). Zaburzenie segregacji może prowadzić do eliminacji lub faworyzowania niektórych genotypów w populacji mapującej, w związku z czym odległości między loci obliczone na podstawie współczynnika rekombinacji i ich pozycje mogą być nieprawidłowe. Z tego powodu właściwym podejściem było wykluczenie markera MLOC_61391 z dalszej analizy.

5.2. Mutacja w genie kodującym czynnik transkrypcyjny bHLH powoduje bezwłośnikowy fenotyp

Sekwencjonowanie wszystkich kandydackich genów z wytypowanego interwału wykazało, że tylko w jednym genie kodującym czynnik transkrypcyjny bHLH (HORVU7Hr1G030250), u mutantu *rh11.b* znajduje się mutacja punktowa A→T, która spowodowała zatrzymanie szóstego intronu o długości 98 pz. Analiza oparta o translację *in silico* wykazała, że zachowanie tego intronu skutkuje przesunięciem ramki odczytu, które prowadzi do powstania 71 nieprawidłowych kodonów w mRNA, w tym kodonu STOP w pozycji 116 pz od początku siódmego eksonu w transkrypcie mutantu *rh11.b*. Prawdopodobnie nieprawidłowy transkrypt zawierający przedwczesny kodon STOP może być kierowany na ścieżkę degradacji, o czym może świadczyć wynik znacznie obniżonej ekspresji genu kandydackiego we wszystkich strefach korzeniach u mutantu *rh11.b* w porównaniu do jego formy wyjściowej. Co istotne, wspomniana wyżej część genu u roślin typu dzikiego koduje domenę LRL (LOTUS JAPONICUS ROOTHAIRLESS1-LIKE). Mutacja w genotypie *rh11.b* prowadzi zatem do braku prawidłowej domeny LRL, co może mieć wpływ na funkcjonowanie białka bHLH. To odkrycie, wraz z brakiem jakiegokolwiek dodatkowej mutacji w innych sekwencjach kodujących znajdujących się w wytypowanym

interwale na mapie fizycznej genomu powoduje, że HORVU7Hr1G030250 jest najbardziej prawdopodobnym kandydatem, w którym zidentyfikowana mutacja może być odpowiedzialna za brak odpowiedniego wzoru ryzodermy i w rezultacie bezwłosnikowy fenotyp korzenia u mutantu *rh11.b*.

Co ważne, wykazano że grupa genów kodujących białka z domeną bHLH stanowi składnik sieci regulacyjnej, uczestnicząc w różnych etapach rozwoju ryzodermy oraz włosników (Breux i inni, 2012; Breuninger i inni, 2016). Na możliwy udział genu HORVU7Hr1G030250 w rozwoju włosników wskazują badania prowadzone dla włosnikowych mutantów *Lotus japonicus*, *Ljrh11* (Karas i inni, 2009) oraz *Oryza sativa*, *Osrh11* (Ding i inni, 2009). W obu przypadkach stwierdzono, że zmienione fenotypy związane są z mutacjami w genach kodujących białka z domeną bHLH, które wykazują wysoki stopień podobieństwa sekwencji białkowych z produktem genu HORVU7Hr1G030250. Warty zaakcentowania jest fakt, że mutant *Osrh11* wykazuje istotne zaburzenia w procesie formowania wzoru ryzodermy, bez wyraźnego tworzenia krótszych i dłuższych komórek charakterystycznych dla typu dzikiego u ryżu (Ding i inni, 2009). Jednocześnie, tylko mutant *Ljrh11* wykazuje fenotyp całkowicie bezwłosnikowy, podczas gdy mutant ryżu *Osrh11* tworzy mocno skrócone włosniki. Dane te wskazują, że zidentyfikowany gen u ryżu prawdopodobnie bierze udział we wczesnych etapach różnicowania komórek ryzodermy.

U jęczmienia ustalanie wzoru ryzodermy zachodzi poprzez asymetryczne wydłużenie komórek potomnych utworzonych po symetrycznym podziale komórki macierzystej, krótsze komórki – trichoblasty wytwarzają wypustkę włosnikową (Marzec i inni, 2013). Podobne mechanizmy powstawania ryzodermy, wraz z różnicami w morfologii i ultrastrukturze tricho- i atrichoblastów, opisano u ryżu (Kim i Dolan, 2011). Z kolei u *L. japonicus* nie występuje specyficzny wzór tworzenia ryzodermy, a każda komórka tej tkanki jest zdolna do wytwarzania włosników. W rezultacie, ogromna większość komórek różnicuje się we włosniki, podczas gdy atrichoblasty występują sporadycznie, a ich rozkład jest losowy (Karas i inni, 2005). Pomimo faktu, że proces ustalania wzoru ryzodermy różni się pomiędzy jęczmieniem i ryżem w porównaniu z *L. japonicus*, prawdopodobne jest, że ustalenie losu komórek może być pod podobną kontrolą genetyczną u tych gatunków, a wszystkie trzy specyficzne białka bHLH mogą być odpowiedzialne za powstawanie jeszcze niezidentyfikowanego sygnału, który kieruje różnicowaniem komórek ryzodermy.

Analiza struktury białka kodowanego przez gen HORVU7Hr1G030250 (*Hvrh11*) wykazała, że zawiera ono dwie konserwatywne domeny: bHLH oraz LRL. Białka zawierające domenę bHLH stanowią drugą co do wielkości rodzinę czynników transkrypcyjnych u roślin

i biorą udział w szerokim zakresie procesów regulacyjnych (Heim i inni, 2003; Feller i inni, 2011; Zhao i inni, 2012). Domena bHLH jest zaangażowana w kontakt z DNA, podczas gdy motywy inne niż bHLH, które zostały zidentyfikowane u wielu członków rodziny bHLH, odpowiadają za swoistość czynnika transkrypcyjnego, związaną z regulacją określonych genów docelowych (Heim i inni, 2003). Co istotne, funkcję domeny LRL związane z kontrolą transkrypcyjną genów zaangażowanych w rozwój włośników u *L. japonicus*, *A. thaliana* i *O. sativa* (Karas i inni, 2009; Bruex i inni, 2012; Ding i inni, 2009). W niniejszej pracy, analiza filogenetyczna sekwencji białka dla genu HORVU7Hr1G030250 (*Hvrhl1*) wykazała znaczące podobieństwo do pięciu białek występujących u Arabidopsis: AtLRL1, AtLRL2, AtLRL3, AtLRL4 oraz AtLRL5, które działają jako dwie antagonistycznie grupy regulatorów wzrostu włośników. Geny LRL klasy I (*AtLRL1*, *AtLRL2*, *AtLRL3*) funkcjonują jako pozytywne regulatory rozwoju włośników, podczas gdy geny LRL klasy II (*AtLRL4* oraz *AtLRL5*) stanowią potencjalne represory transkrypcji (Tam i inni, 2015; Breuninger i inni, 2016). Mutanty w tych genach wykazywały znaczące zaburzenia w różnych stadiach rozwoju włośników (Bruex i inni, 2012; Breuninger i inni, 2016), w związku z czym stwierdzono, że grupa genów LRL jest podstawowym składnikiem sieci regulacyjnej uczestniczącej w powstawaniu włośników. Pojedyncze mutanty w genach kodujących białka LRL wykazywały zaburzenia tworzenia włośników (np. skrócenie lub rozgałęzianie włośników), niezwiązane jednak ze zmienionym wzorem formowania ryzodermy (Bruex i inni, 2012; Breuninger i inni, 2016). Natomiast podwójne mutanty *atrl1-2/atrl3-1* były zdolne jedynie do inicjowania rozwoju włośników. Postuluje się, że geny *AtLRL1*, *AtLRL2* i *AtLRL3* mają redundantną funkcję u Arabidopsis, dlatego pojedyncze mutacje nie powodują silnego fenotypu (Karas i inni, 2009). Co ciekawe, podwójne mutanty homologów *AtLRL1* i *AtLRL2* u *Physcomitrella* nie tworzyły chwytників (ryzoidów), co sugeruje, że białka LRL ewoluowały ze wspólnego przodka mchów i roślin okrytozalążkowych (Tam i inni, 2015). Dane te wskazują także na konserwatywny mechanizm regulacyjny dla różnicowania komórek wykazujących wzrost szczytowy i pełniących funkcję korzeni u mszaków.

Biorąc pod uwagę opisane fenotypy mutantów Arabidopsis i jęczmienia, można postawić hipotezę, że u Arabidopsis białka z domeną LRL działają w procesach wzrostu szczytowego włośników i zapobiegają rozgałęzieniu się włośników, podczas gdy u jęczmienia (i prawdopodobnie u ryżu i *L. japonicus*), kontrolują różnicowanie komórek ryzodermy. Niemniej jednak białka LRL mogą wykazywać pewne nakładanie się funkcji w kontrolowaniu podobnych ścieżek regulacyjnych u Arabidopsis i jęczmienia. Taką możliwość sugerują badania transkryptomowe mutantów Arabidopsis (*atrl1*) (Bruex i inni,

2012) oraz jęczmienia (*rhll.a*) (Kwaśniewski i inni, 2010; 2016). Analiza transkryptomu epidermalnej tkanki korzenia u mutantu *atlr1* doprowadziła do wskazania 10 genów wykazujących zmienioną ekspresję, w porównaniu do formy dzikiej. Geny z obniżoną ekspresją kodowały białka zaangażowane w organizację ściany komórkowej, takie jak endotransglukozylaza ksyloglukanu oraz białka o aktywności peroksydazy, które mogą brać udział rozwoju włośników. W korzeniach jęczmiennego mutantu *rhll.a* (linii siostrzanej mutantu *rhll.b*), geny wykazujące podobne funkcje tzn. związane z budową ściany komórkowej (ekstensyny, arabinogalaktany (AGP), endotransglukozolazy/hydrolazy ksyloglukanu (XTH) i pektynesterazy), również charakteryzowały się obniżoną ekspresją (Kwaśniewski i inni, 2010; Kwaśniewski i inni, 2016). Dodatkowo, u mutantu *rhll.a* wykazano brak ekspresji genu HvEXPB1 kodującego β -ekspansynę 1, białka, które jest zaangażowane w rozluźnianie ściany komórkowej (Kwaśniewski i Szarejko, 2006) oraz genów będących prawdopodobnymi homologami genów *RHD4* (*ROOT HAIR DEFECTIVE4*), *COW1* (*CAN OF WORMS1*) i *SHV3* (*SHAVEN3*) Arabidopsis. Co istotne Bruex i współpracownicy (2012) sugerują, że geny LRL mogą uczestniczyć w regulacji ekspresji *COW1* i *EXP7* (*EXPANSIN A7*) u Arabidopsis. Jest więc prawdopodobne, że geny takie jak HORVU7Hr1G030250, zidentyfikowany w niniejszej pracy, mogą działać bezpośrednio i/lub pośrednio na wiele genów zaangażowanych w procesy rozwoju całego korzenia. Jak dotąd, nie ma zbyt wielu informacji, nawet u modelowej rośliny Arabidopsis, które mogłyby wskazać geny znajdujące się bezpośrednio pod kontrolą czynników transkrypcyjnych LRL. Wiadomo jedynie, że ekspresja genu *AtLRL1* jest niezależna od genu *RHD6*, którego produkt stanowi element ścieżki przekazywania sygnałów hormonalnych, a zatem *AtLRL1* może kontrolować oddzielną ścieżkę procesu różnicowania komórek ryzodermy (Lin i inni, 2015; Hey i inni, 2017).

Niedawno geny *AtLRL1* i *AtLRL2* scharakteryzowano jako czynniki bezpośrednio regulowane przez białko GL2 (Lin i inni, 2015), które działa jako negatywny regulator rozwoju włośników w atrichoblastach Arabidopsis. Białko GL2 hamuje ekspresję wielu czynników transkrypcyjnych z rodziny bHLH, w tym *LRL* i *ROOT HAIR DEFECTIVE SIX-LIKE* (*RSL*, Lin i inni, 2015). Czynniki GL2 rozpoznaje i wiąże się z motywem sekwencyjnym oznaczonym jako L1 box-5'-TAAATGT-3, który jest zlokalizowany w regionach promotorowych kontrolowanych genów (Lin i inni, 2015). Co ciekawe, linie Arabidopsis zawierające konstrukty pGL2::*LRL1*-GFP i pGL2::*LRL2*-GFP charakteryzują się nietypowym rozmieszczeniem włośników, które pojawiają się w komórkach nie wytwarzających włośników u roślin typu dzikiego. W rezultacie, linie te posiadały zwiększoną liczbę

włośników (Lin i inni, 2015; Salazar-Henao i inni, 2016). Dane te mogą sugerować, że *LRL1* i *LRL2* są również zaangażowane w inicjację rozwoju włosników. W przedstawianej pracy doktorskiej przeprowadzono analizę sekwencji promotorowej genu HORVU7Hr1G030250, co pozwoliło na identyfikację sekwencji podobnej do motywu L1, która jest zlokalizowana 332 pz powyżej kodonu startowego. Obecnie nie wiadomo, czy jakkolwiek homolog GL2 może wpływać na ekspresję genu HORVU7Hr1G030250 u jęczmienia, ani nie zidentyfikowano żadnego innego czynnika, który mógłby regulować jego transkrypcję. W niniejszej pracy wykazano, że w typie dzikim jęczmienia występuje znaczący wzrost ekspresji genu kandydata w strefach wydłużenia oraz różnicowania, w porównaniu do strefy merystematycznej korzenia. Zatem związek wielkości ekspresji badanego genu z pojawianiem się włosników sugeruje, że gen ten prawdopodobnie znajduje się pod kontrola nieznanego dotąd nadrzędnego czynnika. Zaobserwowano również, że poziom ekspresji genu kandydata HORVU7Hr1G030250 w korzeniach bezwłosnikowego mutantu jest bardzo niski, w porównaniu do poziomu ekspresji tego genu u formy wyjściowej. Taka obserwacja sugeruje, że istnieją mechanizmy regulatorowe, biorące udział w redukcji ekspresji u mutantu *rhl1.b*. U organizmów eukariotycznych powszechnie występuje proces kontroli jakości mRNA, który polega na szybkiej degradacji transkryptów niosących przedwczesny kodon STOP. Jest możliwe, że zmieniony transkrypt zawierający przedwczesny kodon terminacji translacji, który występuje u mutantu *rhl1.b*, jest rozpoznawany przez wspomniany mechanizm, co zapobiega wytwarzaniu skróconego i potencjalnie szkodliwego białka (Hug i inni, 2016; Nickless i inni, 2017).

W lepszym zrozumieniu złożoności mechanizmów prowadzących do tworzenia wzoru ryzodermy u jęczmienia może pomóc analiza kolejnego bezwłosnikowego mutantu, *brb*, który w poprzednich badaniach Katedry Genetyki UŚ został opisany jako alleliczny w stosunku do mutantu *rhl1.b*. Co zaskakujące, w niniejszych badaniach analiza sekwencji genu kandydackiego HORVU7Hr1G030250 nie doprowadziła do wykrycia żadnych zmian między mutantem *brb*, a jego rodzicielską odmianą 'Pallas', zarówno w eksonach jak i intronach genu. Ponadto, rozszerzenie analiz sekwencji na 4474 pz powyżej i 1882 pz poniżej regionu CDS genu również nie ujawniło żadnych różnic dla tych genotypów. Podobnie, sekwencjonowanie czterech innych genów zlokalizowanych w rejonie wyznaczonym przez markery flankujące nie doprowadziło do identyfikacji mutacji w żadnym z nich. Jedną z hipotez wyjaśniających ten wynik jest możliwość dezaktywacji genu HORVU7Hr1G030250 u mutantu *brb* w wyniku zjawiska zmienności zależnej od pozycji (PEV – Position Effect Variegation), które zostało najdokładniej udokumentowane u *Drosophila melanogaster* oraz

Schizosaccharomyces pombe (Elgin i Reuter, 2013; Allshire i inni, 2017). Ekspresja genu zależy w dużej mierze od jego lokalizacji w genomie, jego sekwencji, jak i obecności sekwencji wzmacniających i wyciszających zlokalizowanych poza obszarem promotora. Ponadto, poważne skutki dla ekspresji genu, zależne od jego lokalizacji, często obejmują epigenetyczne wyciszenie genu umieszczonego w pobliżu nieaktywnych lub heterochromatynowych regionów genomu. Dlatego zjawisko PEV związane jest często z rearanżacją chromosomu, która skutkuje ulokowaniem fragmentu zawierającego heterochromatynę w obszarze lub sąsiedztwie euchromatynowego chromosomu. W ten sposób dochodzi do rozszerzenia obszaru wyciszonych genów, charakterystycznego dla heterochromatyny fakultatywnej, na sąsiadujący rejon euchromatyny. Proces ten jest regulowany przez różne białka zaangażowane zarówno w przebudowę chromatyny, jak i wyciszenie oparte na RNAi. Przykładem opisanego powyżej procesu jest jedna z pierwszych mutacji zidentyfikowanych u *D. melanogaster*, powodująca zmianę pigmentacji oczu z czerwonej na białą. Wykorzystując jako mutagen promienie X, Muller (1930) zaobserwował interesujący fenotyp opisany jako mozaikowe zabarwienie oczu tzn. z polami czerwieni oraz bieli. Taki fenotyp sugerował, że gen warunkujący kolor oczu nie został uszkodzony, gdyż niektóre obszary oka pozostały czerwone. Jednakże gen determinujący kolor oczu został wyraźnie wyciszony w niektórych komórkach oka, w których normalnie powinien ulegać ekspresji. Dopiero późniejsze badanie chromosomów politenicznych wskazało, że tego rodzaju fenotypy są konsekwencją inwersji lub rearanżacji z jednym punktem pęknięcia w heterochromatynie i drugim punktem pęknięcia w sąsiedztwie genu warunkującego określony fenotyp (Elgin i inni, 2013). Zjawiska podobne do PEV zaobserwowano również u *Schizosaccharomyces pombe*. W tym przypadku transgen wbudowany w obszar heterochromatyny został wyciszony (Talbert i Henikoff, 2006). Istnieją wyraźne zależności między efektami pozycji, strukturą chromatyny i wyciszeniem epigenetycznym. Niemniej jednak zjawisko PEV, takie jak zaobserwowano u *Drosophila* i drożdży, nie zostało dobrze udokumentowane w organizmach roślinnych. Ze względu na fakt, iż zjawisko PEV wydaje się być wynikiem rozprzestrzeniania się skondensowanego stanu chromatyny od heterochromatyny do sąsiednich genów i biorąc pod uwagę, że heterochromatyna w dużej mierze składa się z elementów, które mogą ulegać transpozycji, zjawisko PEV może być również postrzegane jako wynik wstawienia elementu transpozycyjnego w bliskie sąsiedztwo genu, co może mieć efekt wyciszający spowodowany epigenetyczną regulacją (Singh i inni, 2008). Przykład takiego zjawiska opisano u *D. melanogaster* w badaniach genu *ald*, odpowiedzialnego za defekty mejozy i mitozy (Gilliland i inni, 2005). Dwa genotypy, które

w testach komplementacji wydawały się alleliczne do innych mutantów *ald*, nie wykazywały żadnej mutacji w sekwencji tego genu. Stwierdzono natomiast obecność transpozonu. Docelowo poniżej locus *ald*, w odległości około 2000 pb, który tłumiał funkcję pobliskiego locus *ald* w komórkach linii płciowej badanych mutantów (Gilliland i inni, 2005). Wiadomo, że ruch transpozonów jest wyciszany przez epigenetyczne modyfikacje chromatyny. Takie modyfikacje mogą obejmować także dużą część chromosomu poza samym transpozonem, co może tworzyć obszar heterochromatyny wokół sąsiadujących genów (Zhang i inni, 2008). Podobne zjawisko opisali Singh i współpracownicy (2008) u kukurydzy, gdzie zaobserwowano dziedziczne wyciszenie transpozonu MuDR przez naturalnie występującą wersję elementu, oznaczoną jako Mu-killer (Muk). Element Muk tworzy długą cząsteczkę RNA o strukturze spinki do włosów, która w kooperacji z białkami kompleksu wyciszającego może wywoływać metylację DNA i w rezultacie dziedziczne wyciszenie jednego lub wielu elementów MuDR (Matzke i inni, 1998; Singh i inni, 2008).

W związku z powyższymi przykładami nie można wykluczyć, że u spontanicznego mutantu *brb* nastąpiło zdarzenie transpozycji prowadzące do lokalnego uformowania się heterochromatyny obejmującej także locus badanego genu kandydackiego HORVU7Hr1G030250. Mogło to spowodować znacznie zmniejszenie poziomu jego ekspresji, która stała się zbyt niska aby aktywować transkrypcję genów podlegających pośredniej lub bezpośredniej regulacji przez HORVU7Hr1G030250. Takie zjawisko może być wyjaśnieniem dlaczego pomimo braku zmian w sekwencji genu oraz w sekwencjach regulatorowych, fenotyp korzenia u mutantu podlega wyraźnej zmianie w stosunku do jego formy wyjściowej.

W niniejszej pracy przeanalizowano ekspresję kilku wybranych genów, które mogą znajdować się pod bezpośrednią lub pośrednią kontrolą czynnika transkrypcyjnego bHLH, kodowanego przez gen HORVU7Hr1G030250 niosący mutację u formy *rh11.b*. Analizę ekspresji tych genów przeprowadzono w trzech strefach korzeni mutantu *brb* i jego odmiany wyjściowej 'Pallas', porównując poziom ich ekspresji do mutantu *rh11.b* i odmiany 'Karat'. Geny te wybrano na podstawie wcześniejszych analiz transkryptomów bezwłosnikowego mutantu i jego odmiany wyjściowej (Kwaśniewski i inni, 2010; 2016). Analizy te pokazały, że poziom ekspresji tych genów był istotnie niższy u mutantów *rh11* i *brb* we wszystkich strefach korzenia, w porównaniu z odpowiednimi strefami u ich form wyjściowych. Dodatkowo, profile ekspresji badanych genów były bardzo zbliżone u obu mutantów. Sugeruje to, że analizowane geny mogą znajdować się w tej samej ścieżce regulacji ekspresji u obu bezwłosnikowych form, być może pod bezpośrednią lub pośrednią kontrolą genu

HORVU7Hr1G030250. Uzyskany wynik sugeruje, że hipoteza dotycząca wyciszania genu kandydata przez formowanie heterochromatyny u mutantu *brb* jest prawdopodobna. Wskazywałoby to również, że dwa różne mechanizmy molekularne mogą być odpowiedzialne za taki sam efekt końcowy u obu mutantów.

W niektórych przypadkach mutacje recesywne w dwóch genach mogą również tworzyć zmutowany fenotyp u podwójnej heterozygoty, co skutkuje fałszywym wynikiem testu komplementacji. Takie zjawisko znane jest jako SSNC (second-site noncomplementation) i obejmuje kilka mechanizmów molekularnych (Hawley i Gilliland, 2006). W pierwszym mechanizmie zakłada się, że w wyniku oddziaływania ze sobą dwóch zmutowanych produktów genów powstaje białkowy kompleks o szkodliwych właściwościach, których pojedyncze białka nie mają. Drugi mechanizm SSNC odnosi się do przypadku, gdzie w podwójnej heterozygotie produkt białkowy zmutowanego genu wyłapuje prawidłowo funkcjonującą część białka produkowanego przez inny gen, tworząc nieaktywny kompleks. Z kolei trzeci, najczęściej występujący mechanizm SSNC, nie wymaga fizycznej interakcji produktów genów, lecz jednoczesne obniżenie aktywności obu produktów genowych powoduje powstanie zmutowanego fenotypu (Hawley i Gilliland, 2006). Biorąc pod uwagę, że gen HORVU7Hr1G030250 koduje czynnik transkrypcyjny, który może regulować dużą liczbę docelowych genów, a jednocześnie sam jest regulowany przez inne czynniki, możliwe jest, że mechanizm SSNC może być odpowiedzią tłumaczącą fałszywy wynik testu komplementacji przeprowadzonego dla *rhll.b* i *brb*. Jednak ze względu na fakt, iż nie zidentyfikowano żadnych rekombinantów w grupie liczącej 200 osobników pokolenia F₂ krzyżówki *rhll.b* x *brb* należy założyć, że drugie hipotetyczne locus powinno znajdować się w bardzo bliskim sąsiedztwie kandydackiego genu HORVU7Hr1G030250, co było przyczyną niewykrycia rekombinacji.

Ostatnia hipoteza wyjaśniająca wyniki testu alleliczności między *rhll* i *brb*, (cechująca się najniższym prawdopodobieństwem), opiera się na dwóch założeniach. Pierwsze zakłada, że mutant *rhll.b*, który powstał w wyniku chemicznej mutagenyzy nie ma jednej, ale dwie mutacje, które mogą znajdować się w bliskim sąsiedztwie. Drugi warunek zakłada, że w genie allelicznym do locus *brb* zlokalizowana jest jak dotąd nieodkryta mutacja. W takim scenariuszu należy uwzględnić, że gen *brb* działa w ścieżce regulacyjnej powyżej genu HORVU7Hr1G030250, i posiada mutację powodującą utratę funkcji, a odległość między tymi dwoma loci jest wystarczająco niska aby nie doszło do rekombinacji. Ostatnie założenie wynika z faktu, że w wyniku krzyżowania *rhll.b* z formą wyjściową zaobserwowano segregację 3:1, wskazując na mutację pojedynczego locus w genotypie *rhll.b*.

Warto również zwrócić uwagę na fakt, iż w interwale wyznaczonym przez flankujące markery, sekwencja DNA o długości ok. 322 kpz (z 577 kpz) nie została opisana funkcjonalnie. Porównywanie nieopisanej części interwału z sekwencjami genomowymi jęczmienia, ryżu, pszenicy, *Aegilops tauschii*, *Setaria italica* i *Zea mays* w bazie danych NCBI nie doprowadziło do identyfikacji istotnych trafień w znane geny, bądź opisane elementy powtarzalne. Jednakże nie można wykluczyć, że w nieopisanym przedziale sekwencji znajdują się pseudogeny lub fragmenty genów. Adnotacja oparte są o homologie sekwencji, biorąc pod uwagę obecność opisanego elementu u innego lub tego samego gatunku. Dlatego można uznać, że część interwału bez adnotacji nie należy do żadnej znanej kategorii, która byłaby opisana w bazach danych, co uniemożliwia oznaczenie jej struktury bądź funkcji. Nie można ostatecznie wykluczyć, że w tym regionie znajduje się więcej nieopisanych genów i mutacja w jednym z nich powoduje bezwłosnikowy fenotyp *brb* i *rh11.b*.

Końcową fazą klonowania pozycyjnego jest walidacja biologicznej funkcji genu kandydata. Najlepszym i bezpośrednim dowodem potwierdzającym udział zmutowanego genu HORVU7Hr1G030250 w tworzeniu bezwłosnikowego fenotypu, jest zastosowanie sekwencji typu dzikiego do transformacji mutantu *rh1*. Przywrócenie fenotypu formy dzikiej potwierdziłoby rolę wyselekcjonowanego genu HORVU7Hr1G030250 w procesie formowania wzoru ryzodermy. Jednakże obecnie wydajny system transformacji dla jęczmienia dostępny jest jedynie dla odmiany Golden Promise, co powoduje, że dalsze potwierdzenie biologicznej funkcji genu HORVU7Hr1G030250 wykracza poza ramy prezentowanej pracy. Komplementacja genetyczna powinna być przedmiotem dalszych badań nad rolą genu HORVU7Hr1G030250 w tworzeniu wzoru ryzodermy i wykształcaniu włosników u jęczmienia.

6. Wnioski

- 1) Zastosowana strategia klonowania pozycyjnego w oparciu o mapę sprzężeń chromosomu 7HS doprowadziła do wytypowania interwału zawierającego region genu *rhll*, o długości 3,7 cM na mapie genetycznej i 577 kbp na mapie fizycznej genomu jęczmienia.
- 2) W wyznaczonym przedziale mapy fizycznej znajduje się pięć genów kandydackich, które posiadają sekwencje o wysokiej wiarygodności, dobrze opisanej strukturze i pozycji w genomie.
- 3) Gen HORVU7Hr1G030250 kodujący czynnik transkrypcyjny z domenami bHLH i LRL jest najbardziej prawdopodobnym kandydatem, który może być zaangażowany w różnicowanie komórek ryzodermy u *H. vulgare*. Jest to jedyny z pięciu genów kandydackich, który niesie mutację punktową różniącą mutantą *rhll.b* od odmiany wyjściowej.
- 4) Białko kodowane przez gen HORVU7Hr1G030250 to czynnik transkrypcyjny z rodziny bHLH, posiadający dwie konserwowane domeny: bHLH oraz LRL. Opisano udział białek z domeną LRL w regulacji genów zaangażowanych w rozwój włósników u *Lotus japonicus*, *Oryza sativa* i *Arabidopsis thaliana*.
- 5) Zidentyfikowana u mutantą *rhll.b* substytucja A→T w pozycji 2145 bp genu HORVU7Hr1G030250 prowadzi do utraty miejsca akceptorowego splicingu między szóstym eksonem a ostatnim intronem w mRNA. Retencja intronu skutkuje zmianą ramki odczytu i wystąpieniem przedwczesnego kodonu STOP w mRNA mutantą. W efekcie, powstała zmiana może prowadzić do degradacji mRNA bądź syntezy białka bHLH o nieprawidłowej budowie domeny LRL.
- 6) Geny kodujące białka zaangażowane w organizację i syntezę ściany komórkowej w komórkach korzeni mogą znajdować się w tej samej ścieżce regulacji ekspresji, pod bezpośrednią lub pośrednią kontrolą czynnika transkrypcyjnego bHLH, na co wskazują analizy poziomu ich ekspresji genu w różnych strefach korzenia u mutantą *rhll.b* i jego odmiany wyjściowej.
- 7) Nie wykryto mutacji w sekwencji genu HORVU7Hr1G030250 u bezwłósnikowego mutantą *brb* allelicznego w stosunku do mutantą *rhll.b*. Jedną z hipotez tłumaczących ten wynik jest możliwe wyciszenie genu

HORVU7Hr1G030250 u mutantu *brb* przez formowanie heterochromatyny w regionie tego genu.

8) Oba mutanty, *rhl1.b* i *brb* wykazywały bardzo zbliżony profil ekspresji genu HORVU7Hr1G030250 i jego potencjalnych genów docelowych w różnych strefach korzenia, co wskazuje, że dwa różne mechanizmy molekularne mogą być odpowiedzialne za taki sam efekt końcowy u obu mutantów.

9) Wykorzystanie populacji mapującej liczącej 4952 osobników F₂ *rhl1.b* x 'Morex' pozwoliło na bezpośrednie zakotwiczenie markerów SNP flankujących locus *rhl1* na opublikowanej mapie fizycznej genomu jęczmienia i wytypowanie genów kandydackich bez konieczności sekwencjonowania klonów BAC.

7. Literatura

- Abe, A., S. Kosugi, K. Yoshida, S. Natsume, H. Takagi, H. Kanzaki, H. Matsumura, K. Yoshida, C. Mitsuoka, M. Tamiru, H. Innan, L. Cano, S. Kamoun and R. Kamoun. 2012. Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nat. Biotechnol.* 30: 174–178
- Acevedo-Garcia, J., N. C. Collins, N. Ahmadinejad, L. Ma, A. Houben, P. Bednarek, M. Benjdia, A. Freialdenhoven, J. Altmüller, P. Nürnberg, R. Reinhardt, P. Schulze-Lefert and R. Panstruga. 2013. Fine mapping and chromosome walking towards the *Ror1* locus in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 126: 2969–82
- Akhunov, E. D., A. W. Goodyear, S. Geng, L. Qi, B. Echalié, B. S. Gill, M. Miftahudin, J. P. Gustafson, G. Lazo, S. Chao, D. O. Anderson, A. M. Linkiewicz, J. Dubcovsky, M. La Rota, M. E. Sorrells, D. Zhang, H. T. Nguyen, V. Kalavacharla, K. Hossain, S. F. Kianian, J. Peng, N. L. V. Lapitan, J. Gonzalez-Hernandez, J. A. Anderson, D. W. Choi, T. J. Close, M. Dilbirligi, K. S. Gill, M. K. Walker-Simmons, C. Steber, P. E. McGuire, C. O. Qualset and J. Dvorak. 2003. The organization and rate of evolution of wheat genomes are correlated with recombination rates along chromosome arms. *Genome Res.* 13: 753–763
- Allshire, R. C. and H. D. Madhani. 2017. Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19: 229–244
- Ariyadasa, R. M. Mascher, T. Nussbaumer, D. Schulte, Z. Frenkel, N. Poursarebani, R. Zhou, B. Steuernagel, H. Gundlach, S. Taudien, M. Felder, M. Platzer, A. Himmelbach, T. Schmutzer, P. E. Hedley, G. J. Muehlbauer, U. Scholz, A. Korol, K. F. Mayer, R. Waugh, P. Langridge, A. Graner and N. Stein. 2014. A Sequence-Ready Physical Map of Barley Anchored Genetically by Two Million Single-Nucleotide Polymorphisms. *Plant Physiol.* 164: 412–423
- Balcerowicz, D., S. Schoenaers and K. Vissenberg. 2015. Cell fate determination and the switch from diffuse growth to planar polarity in *Arabidopsis* root epidermal cells. *Front. Plant Sci.* 6: e1163

- Baumbach, J., J. P. Rogers, R. A. Slattery, N. N. Narayanan, M. Xu, R. G. Palmer, M. K. Bhattacharyya and D. Sandhu. 2012. Segregation distortion in a region containing a male-sterility, female-sterility locus in soybean. *Plant Sci.* 195: 151–156
- Bibikova, T. and S. Gilroy. 2003. Root Hair Development. *J. Plant. Growth. Regul.* 21: 383–415
- Bortiri, E., D. Jackson and S. Hake. 2006. Advances in maize genomics: the emergence of positional cloning. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 164–171
- Botstein, D. and N. Risch. 2003. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat. Genet.* 33: 228–237
- Brady, S. M., S. Song, K. S. Dhugga, J. A. Rafalski and P. N. Benfey. 2007. Combining Expression and Comparative Evolutionary Analysis. The COBRA Gene Family. *Plant Physio.* 143: 172–187
- Breuninger, H., A. Thamm, S. Streubel, H. Sakayama, T. Nishiyama and Dolan, L. 2016. Diversification of a transcription factor family led to the evolution of antagonistically acting genetic regulators of root hair growth. *Curr. Biol.* 26: 1622–1628
- Brown, L. K., T. S. George, J. A. Thompson, G. Wright, J. Lyon, L. Dupuy, S. F. Hubbard and P. J. White. 2012. What are the implications of variation in root hair length on tolerance to phosphorus deficiency in combination with water stress in barley (*Hordeum vulgare*). *Ann. Bot.* 110: 319–328
- Brueggeman, R., N. Rostoks, D. Kudrna, A. Kilian, F. Han, J. Chen, A. Druka, B. Steffenson and A. Kleinhofs. 2002. The barley stem rust-resistance gene *Rpg1* is a novel disease-resistance gene with homology to receptor kinases. *PNAS* 14: 9328–9333
- Bruex, A., R. Kainkaryam, M. Wieckowski, Y. Kan, C. Bernhardt, Y. Xia, X. Zheng, J. Y. Wang, M. M Lee, P. Benfey, P. J. Wolf and J. Schiefelbein, J. 2012. A gene regulatory network for root epidermis cell differentiation in Arabidopsis. *PLoS Genet.* e1002446

- Burge, C. and S. Karlin. 1997. Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J. Mol. Biol.* 268: 78–94
- Buschges, R., K. Hollricher, R. Panstruga, G. Simons, M. Wolter, A. Frijters, R. Van Daelen, T. Van Der Lee, P. Diergaarde, J. Groenendijk, S. Topsch, P. Vos, F. Salamini and P. Schulze-Lefert. 1997. The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88: 695–705
- Bustamante, F. O., L. Aliyeva-Schnorr, J. Fuchs, S. Beier and A. Houben. 2017. Correlating the Genetic and Physical Map of Barley Chromosome 3H Revealed Limitations of the FISH-Based Mapping of Nearby Single-Copy Probes Caused by the Dynamic Structure of Metaphase Chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 152: 90–96
- Campanoni, P. and M. R. Blatt. 2007. Membrane trafficking and polar growth in root hairs and pollen tubes. *J. Exp. Bot.* 58: 65–74
- Carminati, A., J. B. Passioura, M. Zarebanadkouki, M. A. Ahmed, P. R. Ryan, M. Watt and E. Delhaize. 2017. Root hairs enable high transpiration rates in drying soils. *New Phytol.* 216: 771–781
- Chmielewska, B., A. Janiak, J. Karcz, J. Guzy-Wrobelska, B. P. Forster, M. Nawrot, A. Rusek, P. Smyda, P. Kedzierski, M. Maluszynski and I. Szarejko. 2014. Morphological, genetic and molecular characteristics of barley root hair mutants. *J. Appl. Genet.* 55: 433–447
- Choi, J., K. Tanaka, Y. Cao, Y. Qi, J. Qiu, Y. Liang, S. Y. Lee and G. Stacey. 2014. Identification of a plant receptor for extracellular ATP. *Science* 343: 290–294
- Close, T.J., P.R. Bhat, S. Lonardi, Y. Wu, N. Rostoks, L. Ramsay, A. Druka, N. Stein, J. T. Svensson, S. Wanamaker, S. Bozdog, M. L. Roose, M. J. Moscou, S. Chao, R. K. Varshney, P. Szűcs, K. Sato, P. M. Hayes, D. E. Matthews, A. Kleinhofs, G. J. Muehlbauer, J. DeYoung, D. F. Marshall, K. Madishetty, R. D. Fenton, P. Condamine, A. Graner and R. Waugh. 2009. Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics* e10:582

- Collard, B. C. Y., M. Z. Z. Jahufer, J. B. Brouwer and E. C. K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica* 142: 169–196
- Comai, L., K. Young, B. J. Till, S. H. Reynolds, E. A. Greene, C. A. Codomo, L. C. Enns, J. E. Johnson, C. Burtner, A. R. Odden and S. Henikoff. 2004. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. *Plant J.* 37: 778–786
- Cormack, R. G. H. 1937. The development of root hairs by *Elodea canadensis*. *New Phytol.* 36: 19–25
- Crawford, K. M. and P. C. Zambryski. 2001. Non-targeted and targeted protein movement through plasmodesmata in leaves in different developmental and physiological states. *Plant Physiol.* 125: 1802–1812
- Cui, S. T. Suzaki, R. Tominaga-Wada and S. Yoshida. 2017. Regulation and functional diversification of root hairs. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16: 1084–9521
- Cutter, E. G. 1978. The epidermis in: *Plant anatomy*. (London, William Clowes & Sons), 94–106
- Cutter, E. G., and C. Y. Hung. 1972. Symmetric and asymmetric mitosis and cytokinesis in the root tip of *Hydrocharis morsus-ranae* L.. *J. Cell. Sci.* 11: 723–737
- Cutter, E., and L. Feldman. 1970. Trichoblasts in *Hydrocharis*. I. Origin, differentiation, dimensions and growth. *Am. J. Bot.* 57: 190–201
- Cvrčková, F., D. Oulehlová, and V. Žárský. 2015. Formins: Linking Cytoskeleton and Endomembranes in Plant Cells. *Int J. Mol. Sci.* 16: 1–18
- Deng, L., P. Qin, Z. Liu, G. Wang, W. Chen, J. Tong, L. Xiao, B. Tu, Y. Sun, W. Yan, H. He, J. Tan, X. Chen, Y. Wang, S. Li and B. Ma. 2017. Characterization and fine-mapping of a novel premature leaf senescence mutant *yellow leaf and dwarf 1* in rice. *Plant Physiol Biochem.* 111: 50–58
- Ding, W. N., Z. M. Yu, Y. L. Tong, W. Huang, H. M. Chen and P. Wu. 2009. A transcription factor with a bHLH domain regulates root hair development in rice. *Cell Res.* 19: 1309–1311

- Dolan, L. 2017. Root hair development in grasses and cereals (*Poaceae*). *Curr. Opin. Genet. Dev.* 45: 76–81
- Dolan, L., and S. Costa. 2001. Evolution and genetics of root hair stripes in the root epidermis. *J. Exp. Bot.* 52: 413–417
- Dolan, L. 1996. Pattern in the root epidermis: an interplay of diffusible signals and cellular geometry. *Ann. Bot.* 77: 547–53
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11–15
- Echt, C., S. Knapp and B. H. Liu. 1992. Genome mapping with non-inbred crosses using Gmendel 2.0. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 66: 27–29
- Elgin, S. C., and G. Reuter. 2013. Position-effect variegation, heterochromatin formation, and gene silencing in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5: 8
- Eppig, J., and E. M. Eicher. 1983. The mouse linkage map. *J. Hered.* 74: 213–231
- Fekih, R., H. Takagi, M. Tamiru, A. Abe, S. Natsume, H. Yaegashi, S. Sharma, S. Sharma, H. Kanzaki, H. Matsumura, H. Saitoh, C. Mitsuoka, H. Utsushi and H. 2013. Saitoh MutMap+: genetic mapping and mutant identification without crossing in rice. *PLoS One.* 8:e68529.
- Feller, A., K. Machemer, E. L. Braun and E. Grotewold. 2011. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant J.* 66: 94–116
- Ferreira, A., M.F. da Silva, L. da Costa e Silva and C.D. Cruz. 2006. Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genet. Mol. Biol.* 29: 187–192
- Fleury, D., U. Baumann and P. Langridge. 2012. Plant genome sequencing: Models for developing synteny maps and association mapping. In: *Plant Biotechnology and Agriculture*. (Eds.) A. Altman and P. M. Hasegawa. Elsevier Inc., pp. 83–97
- Gahoonia, T. S., D. Care and N. E. Nielsen. 1997. Root hairs and phosphorus acquisition of wheat and barley cultivars. *Plant and Soil* 191: 181–188

- Gahoonia, T. S., N. E. Nielsen, A. J. Priyavadan and A. Jahoor. 2001. A root hairless barley mutant for elucidating genetic of root hairs and phosphorous uptake. *Plant Soil* 235: 211–219
- Gardner, K. A., L. M. Wittern and I. J. Mackay. 2016. A highly recombined, high-density, eight-founder wheat MAGIC map reveals extensive segregation distortion and genomic locations of introgression segments. *Plant Biotechnol J.* 14: 1406–1417
- Garrido-Cardenas, J. A., C. Mesa-Valle and F. Manzano-Agugliaro. 2018. Trends in plant research using molecular markers. *Planta* 3: 543–557
- Gilchrist, E. J. and G. W. Haughn. 2005. TILLING without a plough: a new method with applications for reverse genetics. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 8: 211–215
- Gill, U., R. Brueggeman, J. Nirmala, Y. Chai, B. Steffenson and A. Kleinhofs. 2016. Molecular and genetic characterization of barley mutants and genetic mapping of mutant *rpr2* required for *Rpg1*-mediated resistance against stem rust. *Theor. Appl. Genet.* 129: 1519–1529
- Gilliland, W. D., S. M. Wayson and R. S. and Hawley. 2005. The meiotic defects of mutants in the *Drosophila mps1* gene reveal a critical role of *Mps1* in the segregation of achiasmate homologs. *Curr. Biol.* 15: 672–677
- Gouy, M., S. Guindon and O. Gascuel. 2010. SeaView version 4 : a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27: 221–224
- Green, R. L., J. B. Beard and M. J. Oprisko. 1991. Root hairs and root lengths in nine warm-season turfgrass genotypes. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 116: 965–969
- Grierson, C., E. Nielsen, T. Ketelaarc and J. Schiefelbein. 2014. Root hairs. *The Arabidopsis Book* 12: e0172
- Grün, A., P. Buchner, M. R. Broadley, M. J. Hawkesford and G. Thiel. 2018. Identification and expression profiling of *Pht1* phosphate transporters in wheat in controlled environments and in the field. *Plant Biol.* 2: 374–389

- Guindon, S., J. F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk and O. Gascuel. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59: 307–321
- Guo, Y., W. Lin, Q. Chen, V. A. Vallejo, R. M. Warner. 2017. Genetic determinants of crop timing and quality traits in two interspecific *Petunia* recombinant inbred line populations. *Sci. Rep.* e10: 3200
- Habu, Y., T. Ando, S. Ito, K. Nagaki, N. Kishimoto, F. Taguchi-Shiobara, H. Numa K. Yamaguchi, S. Shigenobu, M. Murata T. Meshi, M. Yano. 2015. Epigenomic modification in rice controls meiotic recombination and segregation distortion. *Mol. Breed.* 35: 1380–3743
- Haling, R. E., L. K. Brown, A. G. Bengough, I. M. Young, P. D. Hallett, P. J. White and T. S. George 2013. Root hairs improve root penetration, root–soil contact, and phosphorus acquisition in soils of different strength. *J. of Ex. Bot.* 64: 3711–3721
- Haling, R. E., L. K. Brown, A. G. Bengough, T. A. Valentine, P. J. White, I. M. Young and T. S. George. 2014. Root hair length and rhizosheath mass depend on soil porosity, strength and water content in barley genotypes. *Planta* 239: 643–651
- Halterman, D. A. and R. P. Wise. 2004. A single-amino acid substitution in the sixth leucine-rich repeat of barley *MLA6* and *MLA13* alleviates dependence on *RAR1* for disease resistance signaling. *The Plant J.* 38: 215–226
- Halterman, D. A., F. Wei and R. P. Wise. 2003. Powdery mildew-induced *Mla* mRNAs are alternatively spliced and contain multiple upstream open reading frames. *Plant Physiol.* 131: 558–567
- Han, Y., M. Xin, K. Huang, Y. Xu, Z. Liu, Z. Hu. Y. Yao, H. Peng, Z. Ni and Q. Sun. 2015. Altered expression of *TaRSL4* gene by genome interplay shapes root hair length in allopolyploid wheat. *New Phytol.* 209: 721–732
- Hassan, H., B. Scheres and I. Blilou. 2010. *JACKDAW* controls epidermal patterning in the *Arabidopsis* root meristem through a non-cell-autonomous mechanism. *Development* 137: 1523–1529

- Hawley, R. S. and W. D Gilliland. 2006. Sometimes the result is not the answer: the truths and the lies that come from using the complementation test. *Genetics* 174: 5–15
- He, X., J. Zeng, F. Cao, I. Ahmed, G. Zhang, E. Vincze and F. Wu. 2015. *HvEXPB7*, a novel β -expansin gene revealed by the root hair transcriptome of Tibetan wild barley, improves root hair growth under drought stress. *J. of Ex. Bot.* 66: 7405–7419
- Heim, M. A., M. Jakoby, M. Werber, C. Martin, B. Weisshaar and P. C. Bailey. 2003. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol. Biol. Evol.* 20: 735–747
- Hey, S. J. Baldauf, N. Opitz, A. Lithio, A. Pasha, N. Provart, D. Nettleton and F. Hochholdinger. 2017. Complexity and specificity of the maize (*Zea mays* L.) root hair transcriptome. *J. Exp. Bot.* 68: 2175–2185
- Higgins, J. D., K. Osman, G. H. Jones, F. C. Franklin. 2014. Factors underlying restricted crossover localization in barley meiosis. *Annu. Rev. Genet.* 48: 29–47
- Hoang, D. T., O. Chernomor, A. von Haeseler, B. Q. Minh and S. V Le. 2017. UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol. Biol. Evol.* 35: 518–522
- Hochholdinger, F., T. J. Wen, R. Zimmermann, P. Chimot-Marolle, O. da Costa e Silva, W. Bruce, K. R. Lamkey, U. Wienand and P. S. Schnable. 2008. The maize (*Zea mays* L.) *roothairless 3* gene encodes a putative GPI-anchored, monocot-specific, COBRA-like protein that significantly affects grain yield. *Plant J.* 54: 888–898
- Hofer, R., M.. 1991. Root hairs. In: *The Plant Roots The Hidden Half*. Y. Waisel, A. Eshel, and U. Kafkafi Marcel Dekker, New York, pp. 129–148
- Horn, R., K. Yi, B. Menand, M. Pernas-Ochoa, S. Takeda, T. Walker and L. Colan. 2009. Root epidermal development in Arabidopsis. *Ann. Rev. of Plant BioL.* 37: 64–82
- Huang, R., Y. Wang, P. Wang, C. Li, F. Xiao, N. Chen, N. Li N, C. Li C, C. Sun, L. Li, R. Chen, Z. Xu, J. Zhu and X. Deng. 2018. A single nucleotide mutation of *IspF* gene involved in the MEP pathway for isoprenoid biosynthesis causes yellow-green leaf phenotype in rice. *Plant Mol. Biol.* 96: 5–16

- Huang, L., X. Shi, W. Wang, K. H. Ryu and J. Schiefelbein. 2017. Diversification of Root Hair Development Genes in Vascular Plants. *Plant Physiol.* 3: 1697–1712
- Huang, J., C. M. Kim, Y. H. Xuan, S. J. Park, H. L. Piao, B. I. Je, J. Liu, T. H. Kim, B. K. Kim and C. D. Han. 2013a. *OsSNDP1*, a Sec14-nodulin domain-containing protein, plays a critical role in root hair elongation in rice. *Plant Mol. Biol.* 82: 39–50
- Huang, J., C. M. Kim, Y. H. Xuan, J. Liu, T. H. Kim, B. K. Kim and C. D. Han. 2013b. Formin homology 1 (*OsFHI*) regulates root-hair elongation in rice (*Oryza sativa*). *Planta* 237: 1227–1239
- Hug, N., D. Longman and J. F. Cáceres. 2016. Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Res.* 44: 1483–1495
- Janiak, A. and I. Szarejko. 2007. Molecular mapping of genes involved in root hair formation in barley. *Euphytica* 157: 95–111
- Jiao, Y., G. Burow, N. Gladman, V. Acosta-Martinez, J. Chen, J. Burke, D. Ware and Z. Xin. 2017. Efficient Identification of Causal Mutations through Sequencing of Bulk F₂ from Two Allelic Bloomless Mutants of *Sorghum bicolor*. *Front. Plant. Sci.* e8: 2267
- Jones, N., H. Ougham, H. Thomas and I. Pasakinskiene I. 2009. Markers and mapping revisited: finding your gene. *New Phytol.* 183: 935–966
- Jones, P., D. Binns, H. Y. Chang, M. Fraser, W. Li, C. McAnulla, H. McWilliam, J. Maslen, A. Mitchell, G. Nuka, S. Pesseat, A. F. Quinn, A. Sangrador-Vegas, M. Scheremetjew, S.Y., Yong, R. Lopez and S. Hunter. 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 30: 1236–1240
- Jorgensen, R. A. 2002. RNA traffics information systemically in plants. *PNAS USA* 99: 11561–11563
- Jost, M., S. Taketa M. Mascher, A. Himmelbach, T. Yuo, F. Shahinnia, T. Rutten, A. Druka, T. Schmutzer, B. Steuernagel, S. Beier, S. Taudien, U. Scholz, M. Morgante, R. Waugh and N. Stein. 2016. A homolog of Blade-On-Petiole 1 and 2 (BOP1/2) controls internode length and homeotic changes of the barley inflorescence. *Plant Physiol.* 171: 1113–1127

- Kalyaanamoorthy, S., B. Q. Minh, T. K. F. Wong, A. von Haeseler and L. S. Jermin. 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods* 14: 587–589
- Karas, B., J. Murray, M. Gorzelak, A. Smith, S. Sato, S. Tabata and K. Szczyglowski. 2005. Invasion of *Lotus japonicus* root hairless 1 by *Mesorhizobium loti* involves the nodulation factor-dependent induction of root hairs. *Plant Physiol.* 137: 1331–1344
- Karas, B., L. Amyot, C. Johansen, S. Sato, S. Tabata, M. Kawaguchi and K. Szczyglowski. 2009. Conservation of *Lotus* and *Arabidopsis* basic helix-loop-helix proteins reveals new players in root hair development. *Plant Physiol.* 151: 1175–1185
- Ketelaar, T. 2013. The actin cytoskeleton in root hairs: all is fine at the tip. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16: 749–56
- Kędziorski, P. 2011. Tworzenie mapy wysokiej rozdzielczości dla genu *rh11* odpowiedzialnego za brak włosników u *Hordeum vulgare*. Praca magisterska wykonana w Katedrze Genetyki Uniwersytetu Śląskiego
- Kim, C. M., C. D. Han and L. Dolan. 2017. RSL class I genes positively regulate root hair development in *Oryza sativa*. *New Phytol.* 213: 314–323
- Kim, C. M., and L. Dolan. 2016. ROOT HAIR DEFECTIVE SIX-LIKE class I genes promote root hair development in the grass *Brachypodium distachyon*. *PLoS Genet.* 12:e1006211
- Kim, C. M., and L. Dolan. 2011. Root hair development involves asymmetric cell division in *Brachypodium distachyon* and symmetric division in *Oryza sativa*. *New Phytol.* 192: 601–610
- Kim, C. M., S. H. Park, B. I. Je, S. H. Park, S. J. Park, H. L. Piao, M. Y. Eun, L. Dolan and C. Han. 2007. *OsCSLD1*, a cellulose synthase-like D1 gene, is required for root hair morphogenesis in rice. *Plant Physiol.* 143: 1220–1230
- Kim, S. Y., M. Sivaguru and G. Stacey. 2006. Extracellular ATP in plants: visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling. *Plant Physiol* 142: 984–992

- Kim, I., F. D. Hempel, K. Sha, J. Pfluger and P. C. Zambryski. 2002. Identification of a developmental transition in plasmodesmatal function during embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 129: 1261–1272
- Komatsuda, T., M. Pourkheirandish, C. He, P. Azhaguvel, H. Kanamori, D. Perovic, N. Stein, A. Graner, T. Wicker, A. Tagiri, U. Lundqvist, T. Fujimura, M. Matsuoka, T. Matsumoto and M. Yano. 2007. Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *PNAS* 104: 1424–1429
- Koppolu, R., N. Anwar, S. Sakuma, A. Tagiri, U. Lundqvist, M. Pourkheirandish, T. Rutten, C. Seiler, A. Himmelbach, R. Ariyadasa, H. M. Youssef, N. Stein, N. Sreenivasulu, T. Komatsuda and T. Schnurbusch. 2013. Six-rowed spike4 (*Vrs4*) controls spikelet determinacy and row-type in barley. *PNAS* 110: 13198–13203
- Kosambi, D.D. 1944. The estimation of map distance from recombination values. *Annals of Eugenics*, 12: 172–175
- Krattinger, S., T. Wicker and B. Keller. 2009. Map-based cloning of genes in *Triticeae* (wheat and barley). In: Feuillet, C. and G. J. Muehlbauer (Eds.) *Genetics and Genomics of the Triticeae*. Springer, New York. pp. 337–357
- Kubát, Z. 2007. Chromosome walking with BAC clones as a method of genome mapping. *Pant Soil Environ.* 53: 447–450
- Kubo, T., T. Takashi, M. Ashikari, A. Yoshimura and N. Kurata N. 2016. Two tightly linked genes at the *hsa1* locus cause both F₁ and F₂ hybrid sterility in rice. *Mol. Plant* 9: 221–232
- Kusano, H., C. Testerink, J. E. Vermeer, T. Tsuge, H. Shimada, A. Oka, T. Munnik and T. Aoyama. 2008. The *Arabidopsis* phosphatidylinositol phosphate 5-kinase PIP5K3 is a key regulator of root hair tip growth. *Plant Cell*. 20: 367–380
- Kunzel, G., L. Korzun and M. Meister. 2000. Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. *Genetics* 154: 397–412

- Kwak, S. H., S. K. Song, M. M. Lee and J. Schiefelbein. 2015. *TORNADO1* regulates root epidermal patterning through the *WEREWOLF* pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* 10: e1103407
- Kwak, S. H. and J. Schiefelbein. 2007. The role of the *SCRAMBLED* receptor-like kinase in patterning the *Arabidopsis* root epidermis. *Dev. Biol.* 302: 118–131
- Kwasniewski, M., A. Daszkowska-Golec, A. Janiak, K. Chwialkowska, U. Nowakowska, G. Sablok, and I. Szarejko. 2016. Transcriptome analysis reveals the role of the root hairs as environmental sensors to maintain plant functions under water-deficiency conditions. *J. Exp. Bot.* 67: 1079–1094
- Kwasniewski, M., K. Chwialkowska, J. Kwasniewska, J. Kusak, K. Siwinski and J. Szarejko. 2013. Accumulation of peroxidase-related reactive oxygen species in trichoblasts correlates with root hair initiation in barley. *J. Plant Physiol.* 70: 185–195
- Kwasniewski, M., A. Janiak, B. Mueller-Roeber and I. Szarejko. 2010. Global analysis of the root hair morphogenesis transcriptome reveals new candidate genes involved in root hair formation in barley. *J. Plant Physiol.* 167: 1076–1083
- Kwasniewski, M., and I. Szarejko. 2006. Molecular cloning and characterization of β -expansin gene related to root hair formation in barley. *Plant Physiol.* 141: 1149–1158
- Lambing, C., F. C. H. Franklin and C. Wang. 2017. Understanding and manipulating meiotic recombination in plants. *Plant Physiol.* 173: 1530–1542
- Lander, E. S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M. J. Daly, S. E. Lincoln and L. Newburg. 1987. MAPMAKER : An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174–181
- Lathrop, G. M., J. M. Lalouel, C. Julier and J. Ott. 1984. Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *PNAS.* 81: 3443–3446
- Leavitt, R.G. 1904. Trichomes of the root in vascular cryptograms and angiosperms. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.* 31: 273–313

- Li, L., S. Hey, S. Liu, Q. Liu, C. McNinch, H-Ch Hu, T-J Wen, C. Marcon, A. Paschold, W. Bruce, P. S. Schnable and F. Hochholdinger. 2016. Characterization of maize *roothairless6* which encodes a D-type cellulose synthase and controls the switch from bulge formation to tip growth. *Sc. Rep.* 6: 12–13
- Li, H., A. Kilian, M. Zhou, P. Wenzl, E. Huttner, N. Mendham, L. McIntyre and R. E. Vaillancourt. 2010. Construction of a high-density composite map and comparative mapping of segregation distortion regions in barley. *Mol. Genet. Genomics* 284: 319–331
- Li, M., G. Xiong, R. Li, J. Cui, D. Tang, B. Zhang, M. Pauly, Z. Cheng and Y. Zhou. 2009. Rice cellulose synthase-like D4 is essential for normal cell-wall biosynthesis and plant growth. *Plant J.* 60: 1055–1069
- Lin, Q., Y. Ohashi, M. Kato, T. Tsuge, H. Gu, L. J. Qu and T. Aoyama. 2015. *GLABRA2* directly suppresses basic helix-loop-helix transcription factor genes with diverse functions in root hair development. *Plant Cell* 27: 2894–2906
- Liu, L., K. Shang-Guan, B. Zhang, X. Liu, M. Yan, L. Zhang, Y. Shi, M. Zhang, Q. Qian, J. Li, Y. Zhou. 2013. Brittle *Culm1*, a COBRA-Like Protein, Functions in Cellulose Assembly through Binding Cellulose Microfibrils. *PLoS*. doi.org/10.1371/journal.pgen.1003704
- Liu, X. W. Su, T. Luo, K. Lv, A. Chen, S. Harris and S. A. Shah. 2017. Development of SSR markers from transcriptomes for *Orinus (Poaceae)*, an endemic of the Qinghai–Tibetan Plateau. *Appl. Plant. Sci.* 5: e1700029
- Liu, X., L. Guo, J. You, X. Liu, Y. He, J. Yuan, G. Liu and Z. Feng. 2010. Progress of Segregation Distortion in Genetic Mapping of Plants. *Res. J. of Agr.* 4: 78–83
- Lu, H., J. Romero-Severson and Bernardo. 2002. Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize. *Theor. Appl. Genet.* 105: 622–628
- Lu, Y. and B. Liu. 1995. *PGRI*, a software for plant genome research: plant genome III; San Diego, CA. 105

- Lucas W.J., B. K. Ham and J. Y. Kim. 2009. Plasmodesmata—bridging the gap between neighboring plant cells. *Trends Cell Biol.* 19: 495–503
- Lüpken, T., N. Stein, D. Perovic, A. Habekuß, I. Krämer, U. Hähnel, B. Steuernagel, U. Scholz, R. Zhou, R. Ariyadasa, S. Taudien, M. Platzer, M. Martis, K. Mayer, W. Friedt and F. Ordon. 2013. Genomics-based high-resolution mapping of the BaMMV/BaYMV resistance gene *rym11* in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 126: 1201–1212
- Lynch, J. P. 2007. Roots of the second green revolution. *Aust. J. Bot.* 55: 493–512
- Mammadov, J., R. Aggarwal, R. Buyyarapu and S. Kumpatla. 2012. SNP markers and their impact on plant breeding. *Int. J. Plant Genomics.* doi: 10.1155/2012/728398
- Manly, K. F., J. Cudmore and J. M. Meer. 2001. Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mammalian Genome* 12: 930–932
- Manzanares, C., S. Yates, M. Ruckle, M. Nay and B. Studer. 2016. TILLING in forage grasses for gene discovery and breeding improvement. *N. Biotechnol.* 33: 594–603
- Marzec, M., M. Melzer and I. Szarejko. 2014. The evolutionary context of root epidermis cell patterning in grasses (*Poaceae*). *Plant Signal Behav.* 9: 1–5
- Marzec, M. and E. Kurczynska. 2014. Importance of symplasmic communication in cell differentiation. *Plant Sig. & Beh.* 9: e27931
- Marzec, M., M. Melzer and I. Szarejko. 2013. Asymmetric growth of root epidermal cells is related to the differentiation of root hair cells in *Hordeum vulgare* (L.). *J. Exp. Bot.* 64: 5145–5155
- Mascher, M., H. Gundlach, A. Himmelbach, S. Beier, S. O. Twardziok, T. Wicker, V. Radchuk, C. Dockter, P. E. Hedley, J. Russell, M. Bayer, L. Ramsay, H. Liu, G. Haberer, X. Q. Zhang, Q. Zhang, R. A. Barrero, L. Li, S. Taudien, M. Groth, M. Felder, A. Hastie, H. Šimková, H. Staňková, J. Vrána, S. Chan, M. Muñoz-Amatriaín, Ounit R. Ounit, S. Wanamaker, D. Bolser, C. Colmsee, T. Schmutzer, L. Aliyeva-Schnorr, S. Grasso, J. Tanskanen, A. Chailyan, D. Sampath, D. Heavens, L. Clissold, S. Cao, B. Chapman, F. Dai, Y. Han, H. Li, X. Li, C. Lin, J. K. McCooke, C. Tan, P.

- Wang, S. Wang, S. Yin, G. Zhou, J. A. Poland, M. Bellgard, L. Borisjuk, A. Houben, J. Doležel, S. Ayling, S. Lonardi, P. Kersey, P. Langridge, G. J. Muehlbauer, M. D. Clark, M. Caccamo, A. H. Schulman, K. F. X. Mayer, M. Platzer, T. J. Close, U. Scholz, M. Hansson, G. Zhang, I. Braumann, M. Spannagl, C. Li, R. Waugh and N. Stein. 2017. A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature* 544: 427–433
- Matzke, A. J. M. and M. A. Matzke. 1998. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr. Opin. Plant Bio.* 1: 142–148
- Mayer, K. F., M. Martis, P. E. Hedley, H. Simková, H. Liu, J. A. Morris, B. Steuernagel, S. Taudien, S. Roessner, H. Gundlach, M. Kubaláková, P. Suchánková, F. Murat, M. Felder, T. Nussbaumer, A. Graner, J. Salse, T. Endo, H. Sakai, T. Tanaka, T. Itoh, K. Sato, M. Platzer, T. Matsumoto, U. Scholz, J. Dolezel, R. Waugh and N. Stein. 2011. Unlocking the Barley Genome by Chromosomal and Comparative Genomics. *The Plant Cell* 23: 1249–1263
- Mayer, K. F., R. Waugh, J. W. Brown, A. Schulman, P. Langridge, M. Platzer, G.B. Fincher, G. J. Muehlbauer, K. Sato, T. J. Close, R. P. Wise and N. Stein. 2012. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491: 711–716
- Mayer, K. F., S. Taudien, M. Martis, H. Simková, P. Suchánková, H. Gundlach, T. Wicker, A. Petzold, M. Felder, B. Steuernagel, U. Scholz, A. Graner, M. Platzer, J. Dolezel and N. Stein. 2009. Gene Content and Virtual Gene Order of Barley Chromosome 1H. *Plant Physiol.* 151: 496–505
- Meister, R., M. S. Rajani, D. Ruzicka and D. P. Schachtman. 2014. Challenges of modifying root traits in crops for agriculture. *Trends Plant Sci.* 19: 779–788
- Michelmore, R.W, I. Paran and R. V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *PNAS USA* 88: 9828–9832
- Muller, H. J. and E. Altenburg E. 1930. The frequency of translocations produced by X-rays in *Drosophila*. *Genetics* 15: 283–311

- Muñoz-Amatriaín, M., M. J. Moscou, P. R. Bhat, J. T. Svensson, J. Bartoš, P. Suchánková, H. Šimková, T. R. Endo, R. D. Fenton, S. Lonardi, A. M. Castillo, S. Chao, L. Cistué, A. Cuesta-Marcos, K. L. Forrest, M. J. Hayden, P. M. Hayes, R. D. Horsley, K. Makoto, D. Moody, K. Sato, M. P. Vallés, B. B. H. Wulff, G. J. Muehlbauer, J. Doležel and T. J. Close. 2011. An improved consensus linkage map of barley based on flow-sorted chromosomes and single nucleotide polymorphism markers. *Plant Genome* 4: 238–239
- Nair, S. K., N. Wang, Y. Turuspekov, M. Pourkheirandish, S. Sinsuwongwat, G. Chen, M. Sameri, A. Tagiri, I. Honda, Y. Watanabe, H. Kanamori, T. Wicker, N. Stein, Y. Nagamura, T. Matsumoto and T. Komatsuda. 2010. Cleistogamous flowering in barley arises from the suppression of microRNA-guided *HvAP2* mRNA cleavage. *PNAS USA* 107: 490–495
- Nestler, J., S. Liu, T. J. Wen, A. Paschold, C. Marcon, H. M. Tang, D. Li, L. Li, R. B. Meeley, H. Sakai, W. Bruce, P. S. Schnable and F. Hochholdinger. 2014. *Roothairless5*, which functions in maize (*Zea mays* L.) root hair initiation and elongation encodes a monocot-specific NADPH oxidase. *Plant J.* 79: 729–40
- Ngu, M. S., M. J. Thomson, M. A. Bhuiyan, C. Ho and R. Wickneswari. 2014. Fine mapping of a grain weight quantitative trait locus, *qGW6*, using near isogenic lines derived from *Oryza rufipogon* IRGC105491 and *Oryza sativa* cultivar MR219. *Genet. Mol. Res.* 13: 9477–9488
- Nguyen, L. T., H. A. Schmidt, A. von Haeseler and B. Q. Minh. 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32: 268–274
- Nickless, A., M. J. Bailis and Z. You. 2017. Control of gene expression through the nonsense-mediated RNA decay pathway. *Cell Biosci.* e7: 26
- Notredame, C., D. G. Higgins and J. Heringa. 2000. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* 302: 205–217
- Oiestad, A. J., J. M. Martin, J. Cook, A. C. Varella and M. J. Giroux. 2017. Identification of Candidate Genes Responsible for Stem Pith Production Using Expression Analysis in Solid-Stemmed Wheat. *Plant Genome* doi: 10.3835/plantgenome2017.02.0008

- Okagaki, R. J., S. Cho, W. M. Kruger, W. W. Xu, S. Heinen and G. J. Muehlbauer. 2013. The barley *UNICULM2* gene resides in a centromeric region and may be associated with signaling and stress responses. *Funct. Integr. Genomics* 13: 33–41
- Oldroyd, G. E. 2001. Dissecting symbiosis: developments in Nod factor signal transduction. *Ann. Bot.* 87: 709–718
- Oldroyd, G. E. D. and R. Dixon. 2014. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26: 19–24
- Oparka, K. J., and S. Santa Cruz. 2000. The great escape: Phloem transport and unloading of macromolecules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 323–347
- Ossowski, S., K. Schneeberger, R. M. Clark, C. Lanz, N. Warthmann and D. Weigel. 2008. Sequencing of natural strains of *Arabidopsis thaliana* with short reads. *Genome Res.* 18: 2024–2033
- Pan, G., X. Zhang, K. Liu, J. Zhang, X. Wu, J. Zhu and J. Tu. 2006. Map-based cloning of a novel rice cytochrome P450 gene *CYP81A6* that confers resistance to two different classes of herbicides. *Plant Mol. Biol.* 61: 933–43
- Pei, W., F. Du, Y. Zhang, T. He and H. Ren. 2012. Control of the actin cytoskeleton in root hair development. *Plant Sci.* 187: 10–18
- Pellio, B., S. Streng, E. Bauer, N. Stein, D. Perovic, A. Schiemann, W. Friedt, F. Ordon and A. Graner. 2005. High-resolution mapping of the *Rym4/Rym5* locus conferring resistance to the barley yellow mosaic virus complex (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2) in barley (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 110: 283–293
- Peters, J. L., F. Cnudde and T. Gerats. 2003. Forward genetics and map-based cloning approaches. *Trends in Plant Sci.* 10: 484–491
- Peterson, R. L., and M. L. Farquhar. 1996. Root hairs: specialized tubular cells extending root surfaces. *Bot. Rev.* 62: 1–40
- Qin, D., J. Dong, F. Xu, G. Guo, S. Ge, Q. Xu, Y. Xu and M. Li. 2015. Characterization and fine mapping of a novel barley stage green-revertible albino gene (*HvSGRA*) by

- bulked segregant analysis based on SSR assay and specific length amplified fragment sequencing. *BMC Genomics* e16: 838
- Ramsay, L., M. Macaulay, S. degli Ivanissevich, K. MacLean, L. Cardle, J. Fuller, K.J. Edwards, S. Tuveesson, M. Morgante, A. Massari, E. Maestri, N. Marmiroli, T. Sjakste, M. Galal, W. Powell and R. Waugh. 2000. A simple sequence repeat based linkage map of barley. *Genetics* 156: 1997–2005
- Rapacz, M., A. Stepień and K. Skorupa. 2012. Internal standards for quantitative RT-PCR studies of gene expression under drought treatment in barley (*Hordeum vulgare* L.): the effects of developmental stage and leaf age. *Acta Physiol. Plant* 5: 1–11
- Reinstadler, A., J. Müller, J. H. Czembor, P. Piffanelli and R. Panstruga. 2010. Novel induced mlo mutant alleles in combination with site-directed mutagenesis reveal functionally important domains in the heptahelical barley Mlo protein. *BMC Plant Biology* doi.org/10.1186/1471-2229-10-31
- Ren, X., J. Wang, L. Liu, G. Sun, C. Li, H. Luo and D. Sun. 2016. SNP-based high density genetic map and mapping of *btwd1* dwarfing gene in barley. *Sci. Rep* e6: 31741
- Richardson, A. E., J. P. Lynch, P. R. Ryan, E. Delhaize, F. A. Smith, S. E. Smith, P. R. Harvey, M. H. Ryan, E. J. Veneklaas, H. Lambers, A. Oberson R. A. Culvenor R. J. Simpson. 2011. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant Soil* 349: 121–156
- Rizzolatti, C., P. Bury, E. Tataru, P. A. Pin, N. Rodde, H. Berge and F. B. H. Mireau. 2017. Map-based cloning of the fertility restoration locus *Rfm1* in cultivated barley (*Hordeum vulgare*). *Euphytica* 213: e276
- Rostoks, N., S. Mudie, L. Cardle, J. Russell, L. Ramsay, A. Booth, J.T. Svensson, S.I. Wanamaker, H. Walia, E.M. Rodriguez, P.E. Hedley, H. Liu, J. Morris, T.J. Close, D.F. Marshall and R. Waugh. 2005. Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress. *Mol. Gen. Genomics* 274: 515–527
- Rounds, C. M. and M. Bezanilla. 2013. Growth mechanisms in tip-growing plant cells. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: 243–265

- Ruiz-Medrano, R., B. Xoconostle-Cázares and W. J. Lucas, 2001. The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 202–209
- Ryan, E., M. Steer and L. Dolan. 2001. Cell biology and genetics of root hair formation in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 215: 140–9
- Salazar-Henao, J. E., I. C. Vélez-Bermúdez and W. Schmidt. 2016. The regulation and plasticity of root hair patterning and morphogenesis. *Development* 143: 1848–1858
- Sánchez-Martín, J., B. Steuernagel, S. Ghosh, G. Herren, S. Hurni, N. Adamski, J. Vrána, M. Kubalaková, S. G. Krattinger, T. Wicker, J. Dolezel, B. Keller and B. B. Wulff. 2016. Rapid gene isolation in barley and wheat by mutant chromosome sequencing. *Genome Biol.* e17: 221
- Sasaki, T., T. Kanno, S. Liang, P. Y. Chen, W. W. Liao, W. D. Lin, A. J. Matzke and M. Matzke. 2015. An Rtf2 domain-containing protein influences pre-mRNA splicing and is essential for embryonic development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 200: 523–535
- Schieffelbein, J., L. Huang and X. Zheng. 2014. Regulation of epidermal cell fate in *Arabidopsis* roots: the importance of multiple feedback loops. *Front. Plant Sci.* 5: 47
- Schieffelbein, J., S. H. Kwak, Y. Wieckowski, C. Barron and A. Bruex. 2009. The gene regulatory network for root epidermal cell-type pattern formation in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 60: 1515–1521
- Schneeberger, K. 2014. Using next-generation sequencing to isolate mutant genes from forward genetic screens. *Nat. Rev. Genet.* 15: 662–676
- Schneeberger, K. and D. Weigel. 2011. Fast-forward genetics enabled by new sequencing technologies. *Trends Plant Sci.* 16: 282–288
- Schneeberger, K., S. Ossowski, C. Lanz, T. Juul, A. H. Petersen, K. L. Nielsen, J. E. Jørgensen, D. Weigel and S. U. Andersen. 2009. SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nat. Methods* 6: 550–551

- Schneider, K. 2005. Mapping populations and principles of genetic mapping. In: Meksem, K. and G. Khal (Eds.) The Handbook of Plant Genome Mapping. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. pp. 3–21
- Schulte, D., R. Ariyadasa, B. Shi, D. Fleury, C. Saski, M. Atkins, P. deJong, C. Wu, A. Graner, P. Langridge and N. Stein. 2011. BAC library resources for map-based cloning and physical map construction in barley (*Hordeum vulgare* L.). BMC Genomics 12: e247
- Segal, E., T. Kushnir, Y. Mualem and U. Shani. 2008. Water uptake and hydraulics of the root hair rhizosphere. Vadose Zone J. 7: 1027–1034
- Seguí-Simarro, J. M. and F. Nuez. 2008. Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. Cytogenet. Genome Res. 120: 358–369
- Semagn, K., Å. Bjørnstad and M. N. Ndjiondjop. 2006. Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. Afr. J. Biotech. 5: 2569–2587
- Shahinnia F., A. Druka, J. Franckowiak, M. Morgante, R. Waugh and N. Stein. 2012. High resolution mapping of *Dense spike-ar* (*dsp.ar*) to the genetic centromere of barley chromosome 7H. Theor. Appl. Genet. 124: 373–384
- Shirasu, K., T. Lahaye, M-W. Tan, F. Zhou, C. Azevedo and P. Schulze-Lefert. 1999. A novel class of eukaryotic zinc-binding proteins is required for disease resistance signaling in barley and development in *C. elegans*. Cell 99: 355–366
- Singh, B. D. and A. K. Singh. 2015a. Fingerprinting and gene cloning. Linkage maps. In Marker-Assisted Plant Breeding: Principles and Practices. Springer, New Delhi. pp.125–150: 341–356
- Singh, B. D. and A. K. Singh. 2015b. Linkage mapping of molecular markers and oligogenes. In: Marker-Assisted Plant Breeding: Principles and Practices. Springer, New Delhi., pp. 125-150; pp. 151–183
- Singh, J., M. Freeling and D. Lisch. 2008. A Position Effect on the Heritability of Epigenetic Silencing. PLOS Genetics 4(10): e1000216

- Singh, S. and J. Singh. 2017. Sequence-based genetic mapping of Ds-tagged insertions to characterize malting-related traits in barley. *The Crop J.* 11–20
- Solovyev, V., P. Kosarev, I. Seledsov and D. Vorobyev. 2006. Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. *Genome Biol.* 7: Suppl. 1: S10 1–2
- Stam, P. 1993. Construction of integrated linkage maps by means of a new computer. *The Plant J.* 3: 739–744
- Stapley, J. P. G. D. Feulner, S. E. Johnston, A. W. Santure and C. M. Smadja. 2017. Variation in recombination frequency and distribution across eukaryotes: patterns and processes. *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.* e372:20160455
- Stein, N., M. Prasad, U. Scholz, T. Thiel, H. Zhang, M. Wolf, R. Kota, R. K. Varshney, D. Perovic, I. Grosse and A. Graner. 2007. A 1,000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. *Theor. Appl. Genet.* 114: 823–839
- Stein, N., D. Perovic, J. Kumlehn, B. Pellio, S. Stracke, S. Streng, F. Ordon and A. Graner. 2005. The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive Bymovirus resistance in *Hordeum vulgare* (L.). *The Plant J.* 42: 912–922
- Stein, N. and A. Graner. 2004. Map-based gene isolation in cereal genomes. In: *Cereal Genomics*. Gupta, P. K. and R. K. Varshney (Eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 331–360
- Stein, N., C. Feuillet, T. Wicker, E. Schlagenhauf and B. Keller. 2000. Subgenome chromosome walking in wheat: A 450-kb physical contig in *Triticum monococcum* L. spans the *Lr10* resistance locus in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *PNAS USA* 97 24: 13436–13441
- Steuernagel, B., J. Vrána, M. Karafiátová, B. B. H. Wulff and J. Doležel. 2017. Rapid Gene Isolation Using MutChromSeq. *Methods Mol. Biol.* 1659: 231–243
- Suiter, K. A., J. F. Wendel and J. S. Case. 1983. Linkage-I: A pascal computer program for the detection and analysis of genetic linkage. *J. Hered.* 74: 203–204

- Sutton, T., U. Baumann, J. Hayes, N. C. Collins, B-J. Shi, T. Schnurbusch, A. Hay, G. Mayo, M. Pallotta, M. Tester and P. Langridge. 2007. Boron-toxicity tolerance in barley arising from efflux transporter amplification. *Science* 318: 1446–144
- Synek, L., N. Schlager, M. Eliás, M. Quentin, M.T. Hauser and V. Zárský. 2006. AtEXO70A1, a member of a family of putative exocyst subunits. specifically expanded in land plants, is important for polar growth and plant development. *Plant J.* 48: 54–72
- Szarejko, I., A. Janiak, B. Chmielewska and M. Nawrot. 2005. Genetic analysis of several root hair mutants of barley. *Barley Genet. Newsl.* 35: 36–38
- Takagi, H., A. Uemura, H. Yaegashi, M. Tamiru, A. Abe, C. Mitsuoka, H. Utsushi, S. Natsume, H. Kanzaki, H. Matsumura, H. Saitoh, K. Yoshida, L.M. Cano, S. Kamoun, R. Terauchi. 2013. MutMap-Gap: whole-genome resequencing of mutant F₂ progeny bulk combined with de novo assembly of gap regions identifies the rice blast resistance gene *Pii*. *New Phytol.* 1: 276–283
- Takahashi, H., A. Watanabe-Takahashi, F. W. Smith, M. Blake-Kalff, M. J. Hawkesford and K. Saito. 2000. The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 23: 171–182
- Taketa S., T. Awayama, S. Amano, Y. Sakurai and M. Ichii. 2006. High-resolution mapping of the nud locus controlling the naked caryopsis in barley. *Plant Breed.* 125: 337–342
- Taketa, S., S. Amano, Y. Tsujino, T. Sato, D. Saisho, K. Kakeda, M. Nomura, T. Suzuki, T. Matsumoto, K. Sato, H. Kanamori, S. Kawasaki and K. Takeda. 2008. Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. *PNAS USA* 105: 4062–4067
- Talbert, P. B. and S. Henikoff. 2010. Centromeres Convert but Don't Cross. *PLoS One* 8: e1000326
- Talbert, P. B. and S. Henikoff. 2006. Spreading of silent chromatin: inaction at a distance *Nat. Rev. Genet.* 7: 793–803

- Tam, T. H., B. Catarino, and L. Dolan. 2015. Conserved regulatory mechanism controls the development of cells with rooting functions in land plants. *PNAS USA* 112: 3959–3968
- Tamura, Y., M. Hattori, H. Yoshioka, M. Yoshioka, A. Takahashi, J. Z. Wu, N. Sentoku and H. Yasui. 2014. Map-based cloning and characterization of a brown planthopper resistance gene *BPH26* from *Oryza sativa* L. ssp. *indica* cultivar ADR52. *Sci Reports*. 4: 5872
- The Arabidopsis-Genome-Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796–815
- The International Barley Genome Sequencing Consortium. 2012. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491: 711–716
- Toledo-Ortiz, G., E. Huq and P. H. Quail. 2003. The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* 15: 1749–1770
- Trifinopoulos, J., L. T. Nguyen, A. von Haeseler and B. Q. Minh. 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 8: 232–235
- Turner, A., J. Beales, S. Faure, R. P. Dunford and D. A. Laurie. 2005. The pseudo-response regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley. *Science* 310: 1031–1034
- Ui, H. M. Sameri, M. Pourkheirandish, M. C. Chang, H. Shimada, N. Stein, T. Komatsuda and H. Handa. 2015. High-resolution genetic mapping and physical map construction for the fertility restorer *Rfm1* locus in barley. *Theor. Appl. Genet.* 128: 283–29
- Underwood, C.J., K. Choi, C. Lambing, X. Zhao, H. Serra, F. Borges, J. Simorowski, E. Ernst, Y. Jacob, I. R. Henderson and R. A. Martienssen. 2018. Epigenetic activation of meiotic recombination near *Arabidopsis thaliana* centromeres via loss of H3K9me2 and non-CG DNA methylation. *Genome Res.* 28: 519–531
- Untergasser, A., H. Nijveen. X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts and J. A. Leunissen. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 35: 71–74

- Van Ooijen, J.W. and R.E. Voorrips. 2001. JoinMap® 3.0, software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, The Netherlands package: JoinMap. The Plant J. 3: 739–744
- Varshney, R.K., T.C. Marcel, L. Ramsay, J. Russell, M.S. Röder, N. Stein, R. Waugh, P. Langridge, R.E. Niks and A. Graner. 2007. A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. Theor. Appl. Genet. 114: 1091–110
- Verbelen, J. P., T. De Cnodder, J. Le, K. Vissenberg and F. Baluska. 2006. The root apex of *Arabidopsis thaliana* consists of four distinct zones of growth activities: meristematic zone, transition zone, fast elongation zone and growth terminating zone. Plant Signal. Behav. 1: 296–304
- Vert, G., N. Grotz, F. Dedaldechamp, F. Gaymard, M. L. Guerinot, J. F. Briata and C. Curie. 2002. IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. Plant Cell 14: 1223–1233
- Vincze, T., J. Posfa and R. J. Roberts. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. Nucleic Acids Research. 31: 3688–3691
- Wang, Y., L. M. Cao, Y. X. Zhang, C. X. Cao, F. Liu, F. K. Huang, Y. F. Qiu R.B., Li and X. J. Lou. 2015. Map-based cloning and characterization of *BPH29*, a B3 domain-containing recessive gene conferring brown planthopper resistance in rice. J. Exp. Bot. 66: 6035–6045
- Wang, C., S. Li, S. Ng, B. Zhang, Y. Zhou, J. Whelan, P. Wu and H. Shou. 2014. Mutation in xyloglucan 6-xylosyltransferase results in abnormal root hair development in *Oryza sativa*. J. Exp. Bot. 65: 4149–4157
- Wang, J., X. Xue and H. Ren. 2012. New insights into the role of plant formins: regulating the organization of the actin and microtubule cytoskeleton. Protoplasma 249: 101–107
- Wei, F., K. Gobelman-Werner, S. M. Morroll, J. Kurth, L. Mao, R. Wing, D. Leister, P. Schulze-Lefert and R. P. Wise. 1999. The *Mla* (powdery mildew) resistance cluster is associated with three NBS-LRR gene families and suppressed recombination within a 240-kb DNA interval on chromosome 5S (1HS) of barley. Genet. Soc. of America 153: 1929–1948

- Wen, T. J. and P. S. Schnable. 1994. Analyses of mutants of three genes that influence root hair development in *Zea mays* (*Gramineae*) suggest that root hairs are dispensable. *Am. J. Bot.* 81: 833–842
- Wen, T. J., F. Hochholdinger, M. Sauer, W. Bruce and P. S. Schnable. 2005. The *roothairless1* gene of maize encodes a homolog of *sec3*, which is involved in polar exocytosis. *Plant Physiol.* 138: 1637–1643
- Won, S. K., S. B. Choi, S. Kumari, M. Cho, S. H. Lee and H. T. Cho. 2010. Root hair specific *EXPANSIN B* genes have been selected for Gramineae root hairs. *Mol. Cells* 30: 369–376
- Wu, Y. P., P. Y. Ko, W. C. Lee, F. J. Wei, S. C. Kuo, S. W. Ho, A. L. Hour, Y. I. Hsing and Y. R. Lin. 2010. Comparative analyses of linkage maps and segregation distortion of two F₂ populations derived from japonica crossed with indica rice. *Hereditas.* 147: 225–236
- Xian-Liang, S., S. Xue-Zhen and Z. Tian-Zhen. 2006. Segregation distortion and its effect on genetic mapping in plants. *J. of Agr. Biotech.* 3: 163–169
- Xiao, C., J. Hu, Y. T. Ao, M. X. Cheng, G. J. Gao, Q. L. Zhang, G. C. He, Y. Q. He. 2016. Development and evaluation of near-isogenic lines for brown planthopper resistance in rice cv. 9311. *Sci. Rep.* 10: e38159
- Xu, Y. H., Q. J. Jia, G. F. Zhou, X. Q. Zhang, T. Angessa, S. Broughton, G. Yan, W. Zhang and C. Li. 2017. Characterization of the *sdw1* semi-dwarf gene in barley. *BMC Plant Biol.* e17: 11
- Yan, L., D. Fu, C. Li, A. Blechl, G. Tranquilli, M. Bonafede, A. Sanchez, M. Valarik, S. Yasuda and J. Dubcovsky. 2006. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *PNAS USA* 103: 19581–19586
- Yang, W., S. Ren, X. Zhang, M. Gao, S. Ye, Y. Qi, Y. Zheng, J. Wang, L. Zeng, Q. Li, S. Huang and Z. He. 2011. *BENT UPPERMOST INTERNODE1* encodes the class II formin FH5 crucial for actin organization and rice development. *Plant Cell* 23: 661–680

- Yoshikawa, T., S.Y. Tanaka Y. Masumoto , N. Nobori, H. Ishii, K.I. Hibara, J.I. Itoh, T. Tanisaka and S. Taketa. 2016. Barley *NARROW LEAFED DWARF1* encoding a WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN3 (*WOX3*) regulates the marginal development of lateral organs. *Breed. Sci.* 66: 416–424
- Yoshioka, M., J. C. M. Iehisa, R. Ohno, T. Kimura, H. Enoki, S. Nishimura, S. Nasuda and S. Takumi S. 2017. Three dominant awnless genes in common wheat: Fine mapping, interaction and contribution to diversity in awn shape and length. *PLoS One* 12: e0176148
- Yuo, T., K. Shiotan, N. Shitsukawa, A. Miyao, H. Hirochika, M. Ichii and S. Taketa. 2011. Root hairless 2 (*rth2*) mutant represents a loss-of-function allele of the cellulose synthase-like gene *OsCSLD1* in rice (*Oryza sativa* L.). *Breed. Sci.* 61: 225–233
- Yuo, T., M. Toyota, M. Ichii and S. Taketa. 2009. Molecular cloning of a root hairless gene *rth1* in rice. *Breed. Sci.* 59: 13–20
- Yuo, T., Y. Yamashita, H. Kanamori, T. Matsumoto, U. Lundqvist, K. Sato, M. Ichii, S. A. Jobling and S. Taketa. 2012. A SHORT INTERNODES (SHI) family transcription factor gene regulates awn elongation and pistil morphology in barley. *J. Exp. Bot.* 63: 5223–5232
- Yuan, S.J, T. Wang, L. Yin, J.F. Zhao, J. M. Wan and X.Y. LI. 2013. Cloning and expression of gene responsible for high-tillering dwarf phenotype in Indica rice mutant *gsor23*. *Rice Sc.* 20: 320–328
- Zang, W., P. E. Eckstein, M. Colin, D. Voth, A. Himmelbach, S. Beier, N. Stein, G. J. Scoles and A. D. Beattie. 2015. Fine mapping and identification of a candidate gene for the barley *Un8* true loose smut resistance gene. *Theor. Appl .Genet.* 128: 1343–1357

- Zhang, C., R. J. Simpson, C. M. Kim, N. Warthmann, E. Delhaize, L. Dolan, M. E. Byrne, Y. Wu and P. R. Ryan. 2018. Do longer root hairs improve phosphorus uptake? Testing the hypothesis with transgenic *Brachypodium distachyon* lines overexpressing endogenous RSL genes. *New Phytol.* 217: 1654–1666
- Zhang, X., S. Shiu, A. Cal and J.O. Borevitz. 2008. Global analysis of genetic, epigenetic and transcriptional polymorphisms in *Arabidopsis thaliana* using whole genome tiling arrays. *PLoS Genet.* 4: 3: doi: 10.1371/journal.pgen.1000032
- Zhao, B., Q.M. Deng, Q. J. Zhang, J. Q. Li, S. P. Ye, Y. S. Liang, Y. Peng and P. Li. 2006. Analysis of segregation distortion of molecular markers in F₂ population of rice. *Acta Genetica Sin.* 5: 449–457
- Zhao, H., X. Li and L. Ma. 2012. Basic helix-loop-helix transcription factors and epidermal cell fate determination in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.* 7: 1556–1560
- Zheng, K., H. Tian, Q. Hu, H. Guo, L. Yang, L. Cai, X. Wang, B. Liu and S. Wang. 2016. Ectopic expression of *R3 MYB* transcription factor gene *OsTCL1* in *Arabidopsis*, but not rice, affects trichome and root hair formation. *Sci. Rep.* 6: e19254
- ZhiMing, Y., K. Bo, H. XiaoWei, L. ShaoLei, B. YouHuang, D. WoNa, C. Ming Hyung-Taeg and W. Ping. 2011. Root hair-specific expansins modulate root hair elongation in rice. *Plant J.* 66: 725–734
- Zhou, X., Y. Xia, X. Ren, Y. Chen, L. Huang, S. Huang, B. Liao, Y. Lei, L. Yan and H. Jiang. 2015. Construction of a SNP-based genetic linkage map in cultivated peanut based on large scale marker development using next-generation double-digest restriction-site-associated DNA sequencing (ddRADseq). *BMC Genomics* 9: 351–366
- Zhou, L., W. Lan, Y. Jiang, W. Fang and S. Luan. 2014. A calcium-dependent protein kinase interacts with and activates a calcium channel to regulate pollen tube growth. *Mol Plant* 7: 369–37
- Zhou, F., J. Kurth, F. Wei, C. Elliott, G. Valè, N. Yahiaoui, B. Keller, S. Somerville, R. Wise and P. Schulze-Lefert. 2001. Cell-autonomous expression of barley *Mla1* confers race-specific resistance to the powdery mildew fungus via a *Rar1*-independent signaling pathway. *The Plant Cell* 13: 337–350

8. Streszczenie

Włośniki korzeniowe są elementem architektury korzenia stanowiącym istotną część jego powierzchni. U wielu gatunków roślin, w tym jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) pierwszym etapem w procesie tworzenia włośników jest różnicowanie komórek ryzodermy i w efekcie utworzenie dwóch typów komórek: trichoblastów, które wytwarzają wypustkę włośnikową oraz atrichoblastów, które nie są zdolne do wytworzenia włośnika. W przypadku jęczmienia różnicowanie trichoblastów i atrichoblastów zależy od niesymetrycznego wydłużania się komórek potomnych powstałych po symetrycznym podziale macierzystej komórki ryzodermy. W rezultacie krótsze komórki stają się trichoblastami.

Celem niniejszej pracy była identyfikacja genu odpowiedzialnego za pierwszy etap morfogenezy włośników, tj. różnicowanie komórek ryzodermy u jęczmienia. Materiał badań stanowiły dwa alleliczne bezwłośnikowe mutanty jęczmienia: *rh11.b* (*root hairless1*), otrzymany na drodze mutagenezy chemicznej odmiany 'Karat' i *brb* (*bald root barley*), spontaniczny mutant odmiany 'Pallas'. Gen *rh11* został wstępnie zlokalizowany w chromosomie 7HS na podstawie wcześniejszych badań Katedry Genetyki UŚ. Prezentowane badania przedstawiają strategię izolacji genu, obejmującą wyprowadzenie populacji mapującej, stworzenie wysokorozdzielczej mapy genetycznej dla rejonu chromosomu obejmującego badany gen, przejście od mapy genetycznej na mapę fizyczną genomu jęczmienia, wytypowanie interwału zawierającego geny kandydackie, sekwencjonowanie tych genów i identyfikacja mutacji, która może być odpowiedzialna za fenotyp mutantu.

W pierwszym etapie badań wyprowadzono liczącą 4952 osobników populację mapującą pokolenia F₂ mutant *rh11.b* x odmiana 'Morex', na podstawie której stworzono mapę genetyczną przy użyciu markerów SSR, SNP oraz InDel. Markery wybrano na podstawie analizy informacji literaturowych, dotyczących map genetycznych jęczmienia, jak i internetowych baz danych (Genome Zipper, Ensembl Plants). Genotypowanie wybranych sekwencji ze zidentyfikowanym polimorfizmem SNP/InDel prowadzono z wykorzystaniem subpopulacji mapującej obejmującej 1472 roślin F₂ oraz 228 rekombinantów między locus *rh11* a flankującymi go na mapie genetycznej markerami SSR. Ostatecznie, po kilku rundach wzbogacania mapy markerami SNP, zidentyfikowano sekwencje flankujące region genu *rh11*, którymi były: MLOC_4840 (2,2 cM od strony dystalnej genu) oraz MLOC_35776 (1,5 cM od strony proksymalnej). Utworzony interwał o długości 3,7 cM, na mapie fizycznej genomu jęczmienia, zamieszczonej w bazie Ensembl Plants, obejmuje region o długości 577 kpz.

Wykorzystanie opublikowanej mapy fizycznej genomu jęczmienia pozwoliło pominąć etapy „chodzenia po chromosomie” w celu poszukiwania genów kandydackich.

W wytypowanym rejonie fizycznej mapy chromosomu 7HS jęczmienia zidentyfikowano tylko pięć genów kandydackich, które poddano sekwencjonowaniu u mutantu *rhll.b* i odmianie ‘Karat’. Tylko w jednym genie kandydackim, HORVU7Hr1G030250, kodującym czynnik transkrypcyjny z rodziny bHLH, zidentyfikowano mutację A→T, różniącą mutantą od odmiany rodzicielskiej. Mutacja wystąpiła w konstytutywnym miejscu splicingowym, między szóstym eksonem a szóstym intronem i mogła prowadzić do utraty miejsca akceptorowego splicingu. Wykazano kosegregację genu kandydackiego HORVU7Hr1G030250 z fenotypem strefy włóśnikowej korzeni w populacji mapującej F₂ *rhll.b* x ‘Morex’.

Analiza *in silico* miejsca mutacji i określenie jej potencjalnego wpływu na proces splicingu oraz strukturę syntetyzowanego białka wykazała, że zmiana A→T w genie HORVU7Hr1G030250 skutkuje zatrzymaniem ostatniego intronu, a w efekcie przesunięciem ramki, syntezą 71 nieprawidłowych aminokwasów i wprowadzeniem przedwczesnego kodonu STOP w mRNA bezwłóśnikowego mutantu *rhll*. Zatrzymanie intronu w mRNA genu w korzeniach mutantu *rhll.b* potwierdzono eksperymentalnie. Analiza sekwencji białkowej genu HORVU7Hr1G030250 wskazała na obecność dwóch konserwowanych domen: bHLH oraz LRL, kluczowych dla ich aktywności w procesie regulacji ekspresji genów. U mutantu *rhll.b*, powstanie mRNA z przedwczesnym kodonem STOP może prowadzić do degradacji transkryptu, o czym może świadczyć obniżona ekspresja genu HORVU7Hr1G030250 wykazana we wszystkich strefach korzeni mutantu, w porównaniu do odmiany ‘Karat’. Skutkiem mutacji może też być synteza białka bHLH z nieprawidłową sekwencją domeny LRL, która u *Arabidopsis* bierze udział w regulacji rozwoju włóśników.

Powyższe wyniki sugerują, że gen HORVU7Hr1G030250 jest najbardziej prawdopodobnym kandydatem, mutacja w którym odpowiada za brak zróżnicowania komórek epidermalnych korzenia. U allelicznego, do *rhll.b*, mutantu *brb* nie zidentyfikowano jednak żadnej mutacji, zarówno w genie HORVU7Hr1G030250 i jego sekwencjach regulatorowych, jak i w pozostałych czterech genach z wyznaczonego interwału. W prezentowanej pracy przedyskutowano ten wynik w świetle danych literaturowych oraz przeprowadzonej dla obu bezwłóśnikowych mutantów i ich odmian wyjściowych analizy profili ekspresji wybranych genów, będących możliwymi genami docelowymi dla HORVU7Hr1G030250.

9. Summary

Root hairs are the part of root architecture contributing significantly to the root surface area. In many species including barley (*Hordeum vulgare* L), the patterning of rhizodermis is the first stage of root hairs development. It results in the formation of two types of cells: trichoblasts, which became the root hair cells and atrichoblasts, which are not capable of producing the root hairs. In *H. vulgare* trichoblasts and atrichoblasts differentiation depends on the asymmetrical elongation of daughter cells that are produced after symmetrical division of their mother cell. As a result, the shorter cells develop into the trichoblasts.

The aim of this study was to identify a gene responsible for the first stage of barley root hairs morphogenesis, i.e. the rhizodermis differentiation in barley. A root hairless mutant *rh11.b* (*root hairless1*) obtained after chemical mutagenesis of variety ‘Karat’ was used in the study. Additionally, a spontaneous root hairless mutant *brb* (**bald root barley**) from cv. ‘Pallas’ was analyzed. In previous studies of the Department of Genetics, University of Silesia, the *rh11* gene was mapped on chromosomes 7HS. The presented thesis demonstrates a map-based gene isolation approach, comprising of: development of mapping population and construction of high resolution genetic map of the region of interest, transition from genetic map to the physical map of barley, selection and sequencing candidate genes, and the identification of a mutation, which may be responsible for the mutant phenotype.

At first, mapping population consisting of 4952 F₂ individuals was derived from the cross between *rh11.b* mutant and ‘Morex’ variety. Based on this population, the genetic map was developed using SSR, SNP and InDel markers. The markers were selected from literature data on barley genetic maps and the internet databases (Genome Zipper, Ensembl Plants). Genotyping of the polymorphic SNP/InDel markers was performed using a sub-population of 1472 F₂ plants and for 228 recombinants between the SSRs flanking *rh11* locus. Finally, following several rounds of map enrichment, the markers flanking the *rh11* gene region were identified: MLOC_4840 (2.2 cM distal from the gene position) and MLOC_35776 (1.5 cM at the proximal site of the gene). They established an interval of a total length of 3.7 cM, which corresponds to 577 kbp region on the physical map of barley genome, according to Ensembl Plant database. The utilization of published physical barley genome map allowed to skip the “chromosome walking” phase of candidate gene search.

Five candidate genes were identified within the physical interval on the 7HS chromosome, and all of them were sequenced in *rh11.b* mutant and ‘Karat’ variety. Only in

one candidate gene, HORVU7Hr1G030250 (MLOC_38567) the A→T mutation was identified, differing the mutant from its parent variety. The mutation was located in the 3' splice-junction site, between sixth exon and sixth intron and it lead to the loss of splicing acceptor site. The co-segregation of the candidate gene with the root hair phenotype was confirmed, based on the analysis of F₂ *rhll.b* x 'Morex' mapping population.

The *in silico* analysis of the mutation site and its potential influence on the splicing process and the structure of the synthesized protein showed that the mutation causes the retention of the of last intron, the frameshift, the synthesis of 71 abnormal amino acids and the introduction of premature STOP codon in mRNA of *rhll* mutant. The intron retention in the mRNA of the gene in the mutant *rhll.b* roots was confirmed experimentally. The analysis of protein sequence encoded by HORVU7Hr1G030250 gene resulted in the identification of two conserved domains: bHLH and LRL, which are the key elements for the regulatory properties of bHLH transcription factor protein.

In *rhll.b* mutant, the synthesis of mRNA with a premature STOP codon can lead to transcript degradation, as the reduced expression of the HORVU7Hr1G030250 gene in all root zones of the mutant, compared to the 'Karat' variety, was observed. The mutation may also result in the synthesis of the bHLH protein with the abnormal sequence of the LRL domain, which in Arabidopsis is involved in the regulation of root hair development.

The above mentioned findings suggest that the HORVU7Hr1G030250 gene is the most promising candidate responsible for the rhizodermis patterning in barley and that the identified mutation causes the lack of root epidermal cells differentiation. We did not find any changes between *brb* mutant, allelic to *rhll.b*, and its parent variety 'Pallas' in the sequence of HORVU7Hr1G030250 candidate gene, both in the gene body and a substantial region of upstream and downstream sequences, neither in any other candidate genes. In the presented thesis, this result was discussed in the light of the literature data and the analysis of the expression profiles of selected genes that may be the possible target genes for HORVU7Hr1G030250. Such analysis was performed for both hairless mutants and their parent varieties.

10. Aneks

Tabela 10.1. Skład buforu ekstrakcyjnego mikro C-TAB (100 ml).

Składnik	Ilość	Koncentracja
C-TAB	2 g	2 %
Tris-HCl 1 M pH=8	10 ml	100 mM
EDTA 0,5 M pH=8	4 ml	20 mM
NaCl 5 M	28 ml	1,4 M
β-merkaptetanol	1 ml	1 %
ddH ₂ O	do 100 ml	

Tabela 10.2. Skład buforu TE (100 ml).

Składnik	Ilość	Koncentracja
Tris-HCl 1 M pH=8	1 ml	10 mM
EDTA 0,5 M pH=8	200 µl	1 mM
ddH ₂ O	do 100 ml	

Tabela 10.3. Skład roztworu RNAzyA (1,1 ml).

Składnik	Ilość	Koncentracja
0,01 M Octan sodu pH (5,2)	1 ml	9 mM
RNAzaA	10 mg	1 mM
1 M Tris HCl (pH 7,2)	0,1 ml	90 mM

Tabela 10.4. Skład roztwór 6% żelu poliakrylamidowego (20 ml).

Składnik	Ilość
7 M mocznik	8,4 g
10x TBE	2 ml
30% akrylamid/bisakrylamid	4 ml
10% APS	150 µl
TEMED	15 µl
ddH ₂ O	do 20 ml

TBE – Tris/Borate/EDTA, APS – AmmoniumPerSulfate (nadsiarazan amonu), TEMED – N,N,N',N'-TetraMethylEthyleneDiamine (N, N, N',N'-TetraMetyloEtylenoDwuamina)

Tabela 10.5. Skład buforu 10x TBE używanego do elektroforezy (1 l).

Składnik	Ilość
Tris-HCl	162 g
Kwas borowy	27,5 g
EDTA	9,3 g
ddH ₂ O	do 1000 ml

EDTA – EthyleneDiamineTetraAcetate (kwas etylenodiaminotetraoctowy)

Tabela 10.6. Skład buforu do ładowania z formamidem, tzw. „stop bufor” (10 ml).

Składnik	Ilość
Formamid (Sigma)	8,8 ml
Bromophenol Blue/Xylene Cyanol (Sigma)	1 ml
EDTA 0,5 M pH=8	200 µl

Tabela 10.7. Skład buforu do ładowania z sacharozą (5 ml).

Składnik	Ilość
Sacharoza (Sigma)	2 g
Bromophenol Blue/Xylene Cyanol (Sigma)	0,2 ml
ddH2O	4,8 ml

Tabela 10.8. Bufor 10 x dla CEL I – NIOB (1 l).

Składnik	Ilość
MgSO ₄ , 1M	100 ml
Hepes, 1M, pH 7.0	100 ml
KCl, 2M	50 ml
Triton X-100, 10%	2 ml
BSA, 20 mg/ml	100 µl
ddH2O	648 ml

Tabela 10.9. Sekwencje starterów, specyficzne warunki PCR dla genotypowania markerów SSR.

Nazwa markera	Starter forward	Starter reverse	Temp. przyłączenia staterów	Liczba cykli PCR
scssr07970	TGCATTGGGAGTGCTAGG	TGCAAGAAGCCAAGAATACC	60°C	25
GBM1464	ATAGCCGTGCTCTTGCTCAT	CAAGACCACCATTTGCATTG	60°C ($\Delta T = -0.5^\circ\text{C}$) 55°C	10 25
EBmatc0016	CCAACCAAGATAATGTGCTTG	ATCCTTATGCTCCTCGCTG	65°C ($\Delta T = -0.5^\circ\text{C}$) 60°C	5 23

Tabela 10.10. Sekwencje starterów, specyficzne warunki PCR i metody genotypowania, które zostały użyte w analizie segregacji markerów w populacji mapującej.

Nazwa markera	Starter forward	Starter reverse	Temp. przyłączenia staterów	Liczba cykli PCR	Metoda genotypowania	Enzym	Temperatura inkubacji
MLOC_56159	TCATCTGCTTGTATGGAAGTGC	CAGCGACGGTAGGGTAACAC	58°C	33	CAPS	<i>TaqI</i>	65°C
MLOC_35776	GGGACGAATTTGGGCAACTG	CACTTGCAGACTCACTCGGT	58°C	33	CAPS	<i>BstNI</i>	37°C
MLOC_35776	GGGACGAATTTGGGCAACTG	CACTTGCAGACTCACTCGGT	58°C	32	CAPS	<i>TaqI</i>	65°C
MLOC_58272	TGCTCCCGATGATGAATGAC	CGTGGGTAGAATGTGTGTGC	60°C	35	CAPS	<i>EcoRI</i>	37°C
MLOC_61391	ATGCTCCTGTATCGACAGCG	CCAATTTTGCAAGGTCGGCA	58°C	33	CAPS	<i>PstI</i>	37°C
2_1491	GTGTGACCGCCTCTACATCA	GCATAAACCAACTCCACGAGA	56°C	35	CAPS	<i>MluI</i>	37°C
MLOC_36745	GTTGGTGGGTTAGCTCCCTC	CAGGAATGCACGATTGCTCG	57°C	33	CAPS	<i>BshNI</i>	37°C
MLOC_61880	CGTCTTTAGGGTCAGGTTGG	CTGGTTGGTGGTTGTCAC TG	58°C	33	InDel	-	-
MLOC_74692	GACGAGAAGCGGATGAAGAG	CCAGGGAAAGTGCGTGAG	60°C	29	InDel	-	-
MLOC_12900	CCTCCGCCACTGAGTTAGAG	AATGCCGTATGCTGGTAAGG	60°C	35	InDel	-	-
MLOC_56157	GCCAGGAAAGGGTCTGATGG	GCTGAAGGAAGTTGTCGTGC	60°C	35	InDel	-	-
MLOC_38567	CTGTCTAGCTCACGGGTCAC	CGCACGCTTCGACGG	58°C	33	InDel	-	-
MLOC_56157	GCCAGGAAAGGGTCTGATGG	GCTGAAGGAAGTTGTCGTGC	58°C	35	InDel	-	-
3_0752	CAGTCTCGCATCTTGAGTTCC	ACTATGGCCAGCCTCAGAGA	56°C	40	HRM	-	-
MLOC_38567	TGAAAGCCAGGAATCTCTCC	CAGAAGCAGGGAAACACAGA	58°C	33	EcoTILLING	-	-
HORVU7Hr1G030280	GCACCCCGTACTGTTGTTTG	GAGTCCTCCTGAATTACCGTT	60°C	33	CAPS	-	-
HORVU7Hr1G030290	GTGGACCGCGACAGGAG	CACCCATTTCCCGCCATCTC	57°C	32	InDel	-	-

Tabela 10.11. Skład mieszaniny do amplifikacji PCR dla loci: 2_1491; 1_0772; 3_0752.

Składnik	Ilość (μl)
ddH2O	12,5
10 x PCR bufor	2
dNTPs (50 ng/μl, Sigma-Aldrich)	1
starter forward (100 ng/μl, Sigma-Aldrich)	0,5
starter reverse (100 ng/μl, Sigma-Aldrich)	0,5
DyNAzyme II DNA Polimeraza (2 U/μl, Finnzymes)	0,5
Matryca DNA	3
Całkowita objętość	20

Tabela 10.12. Skład mieszaniny do amplifikacji PCR dla loci: MLOC_36745, MLOC_61880, MLOC_74692, MLOC_58272, MLOC_56159, MLOC_56157, MLOC_35776, MLOC_12900.

Składnik	Ilość (μl)
ddH2O	13,5
10 x PCR bufor	2
dNTPs (50 ng/μl, Sigma-Aldrich)	1
starter forward (100 ng/μl, Sigma-Aldrich)	0,5
starter reverse (100 ng/μl, Sigma-Aldrich)	0,5
Polimeraza ColorTaq (EUR _X) (2 U/μl, Finnzymes)	0,5
Matryca DNA	2
Całkowita objętość	20

Tabela 10.13. Skład mieszaniny do amplifikacji PCR dla locus HORVU7Hr1G030250_In/Del.

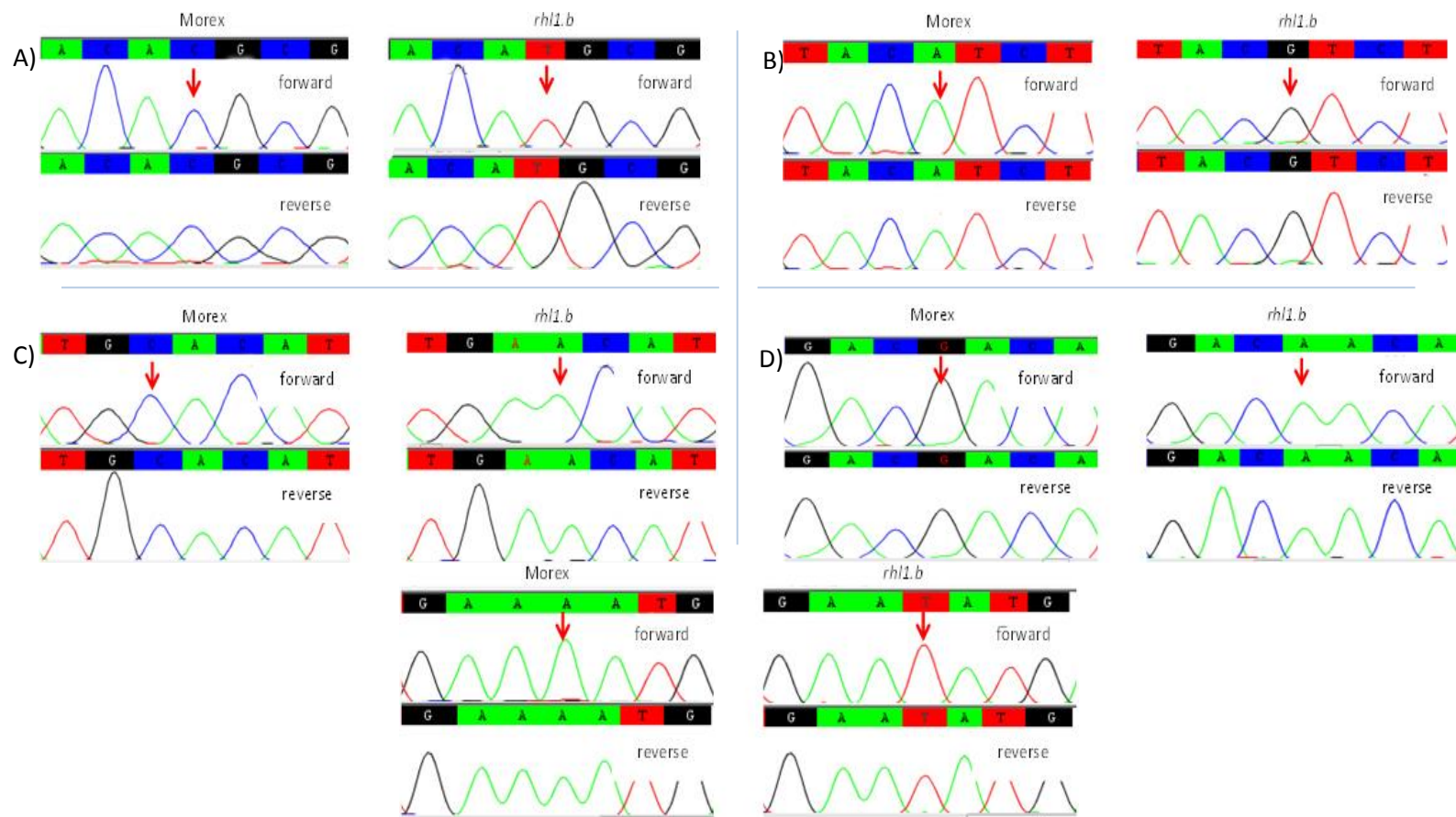
Składnik	Ilość (μl)
ddH2O	6
Maxima Hot Start PCR Master Mix (Thermo Scientific)	10
starter forward (100 ng/μl, Sigma-Aldrich)	0,5
starter reverse (100 ng/μl, Sigma-Aldrich)	0,5
Matryca DNA	2
Całkowita objętość	20

Tabela 10.14. Skład mieszaniny do amplifikacji PCR dla loci: MLOC_56159; MLOC_35776; MLOC_35776; MLOC_58272; MLOC_61391; 2_1491; MLOC_36745.

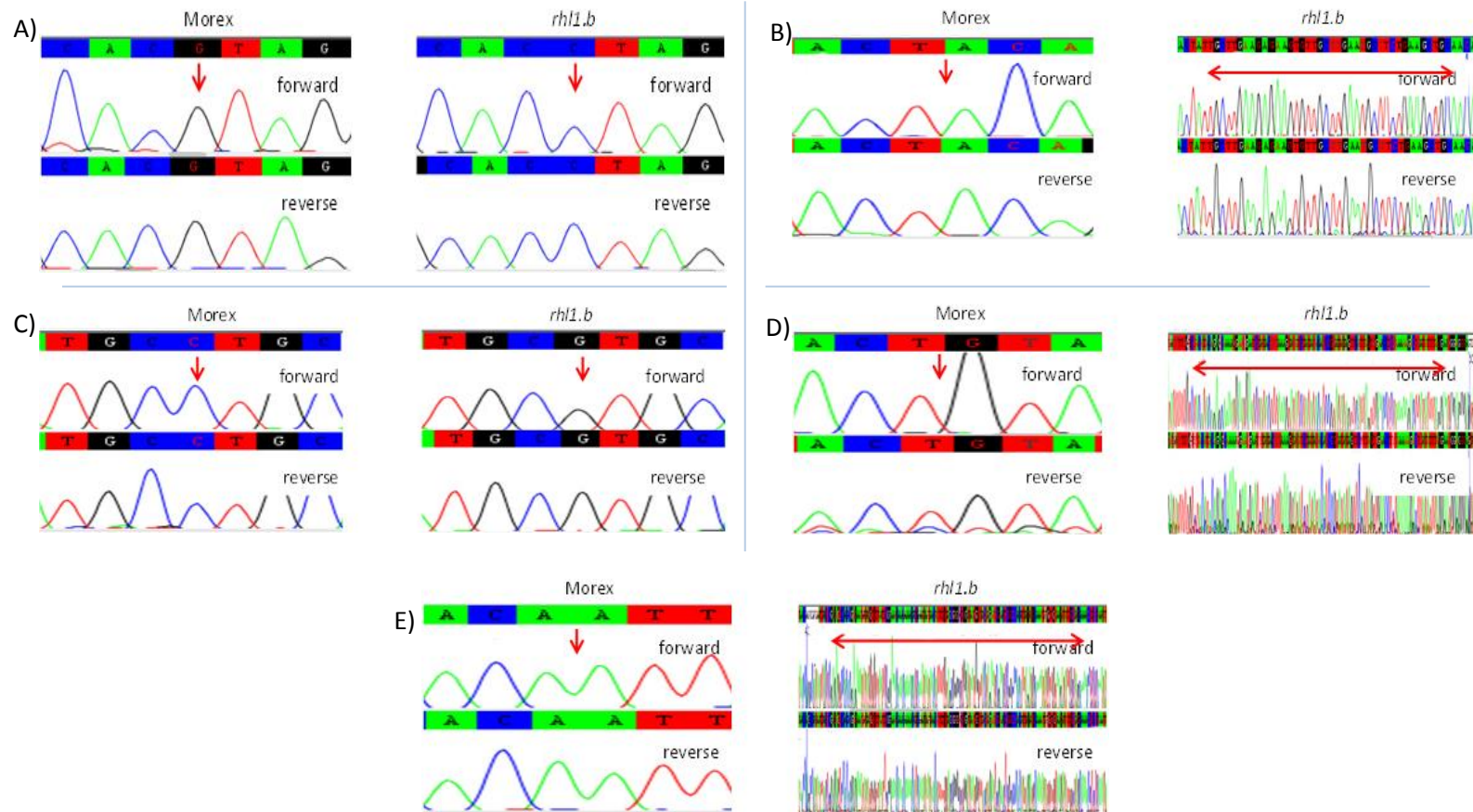
Składnik	Ilość (μl)
ddH ₂ O	5,5
produkt PCR	2,5
bufor (detykowany dla enzymu)	1
enzym	1
Całkowita objętość	10

Tabela 10.15. Skład mieszaniny do amplifikacji PCR dla locus 1_0772.

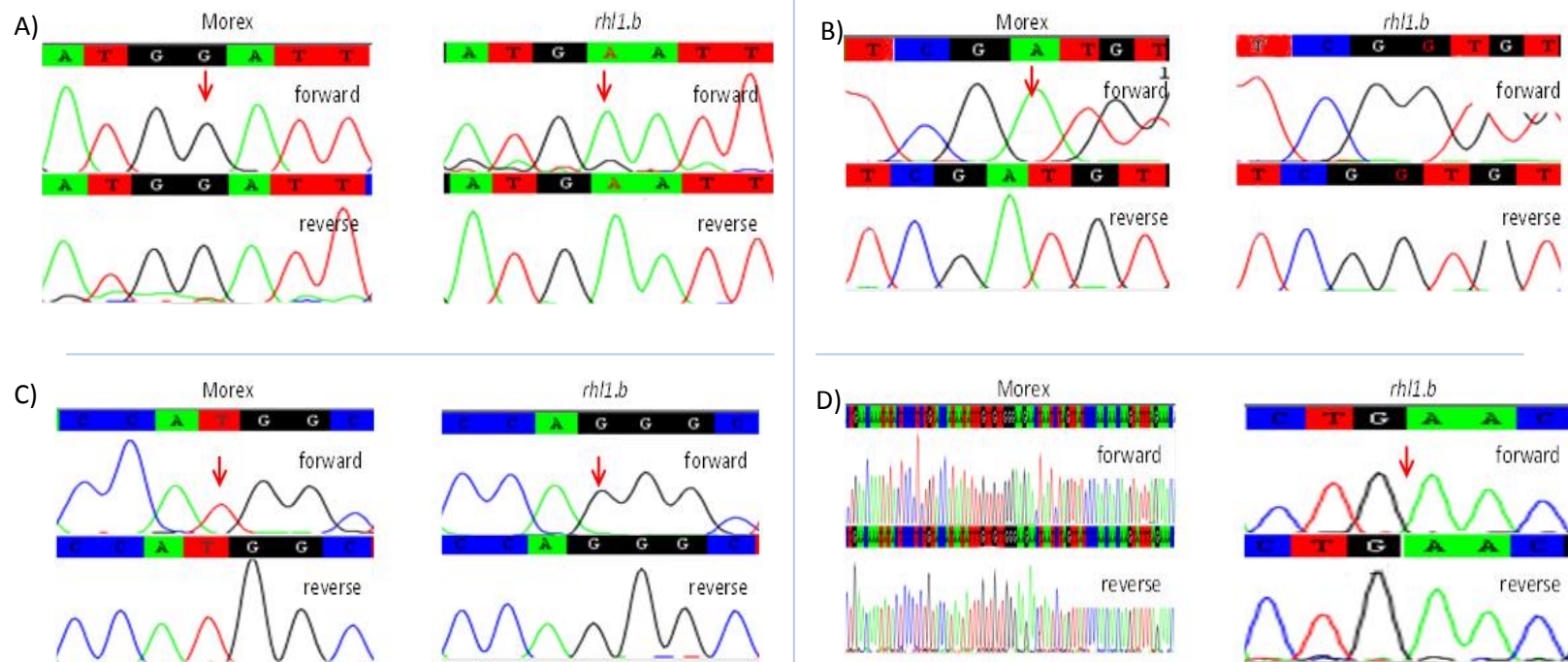
Składnik	Ilość (μl)
ddH ₂ O	6,5
produkt PCR	2,5
bufor Tango	0,5
Enzym <i>Esp3I</i>	0,5
Całkowita objętość	10



Rycina 10.1. Fragmenty chromatogramów w kierunku forward oraz odwrócone komplementarnie sekwencje reverse, utworzone za pomocą programu CodonCode Aligner. Porównanie sekwencji amplikonów dla odmiany 'Morex' oraz mutantu *rh11.b*. (A) Chromatogramy potwierdzające obecność zmiany $CG \rightarrow TA$ w pozycji 228 fragmentu 2_1491. (B) Chromatogramy potwierdzające obecność zmiany $AT \rightarrow GC$ w pozycji 272 fragmentu 1_0772. (C) Chromatogramy potwierdzające obecność zmiany $CG \rightarrow AT$ w pozycji 540. fragmentu 3_0752. (D) Chromatogramy potwierdzające obecność zmiany $GC \rightarrow AT$ w pozycji 650 fragmentu 3_530. (E) Chromatogramy potwierdzające obecność zmiany $AT \rightarrow TA$ w pozycji 114 fragmentu 00460. Kolor zielony – adenina, czerwony – tymina, czarny – guanina, niebieski – cytozyna, czerwona strzałka – pozycja zmiany.



Rycina 10.2 . Fragmenty chromatogramów w kierunku forward oraz odwrócone komplementarnie sekwencje reverse, utworzone za pomocą programu CodonCode Aligner. Porównanie sekwencji ampikonów dla odmiany 'Morex' oraz mutantu rh11.b. (A) Chromatogramy potwierdzające obecność zmiany $G \rightarrow C$ w pozycji 403 fragmentu MLOC_36745. (B) . Chromatogramy potwierdzające obecność zmiany typu In/Del o długości 43 nukleotydów dla fragmentu MLOC_61880. (C) . Chromatogramy potwierdzające obecność zmiany $C \rightarrow G$ w pozycji 532 fragmentu MLOC_61391. (D) Chromatogramy potwierdzające obecność zmiany typu In/Del o długości 198 nukleotydów dla fragmentu MLOC_74692. (E) Chromatogramy potwierdzające obecność zmiany $G \rightarrow A$ w pozycji 374 fragmentu MLOC_58272. Kolor zielony – adenina, czerwony – tymina, czarny – guanina, niebieski – cytozyna, czerwona strzałka – pozycja zmiany.



Rycina 10.3. Fragmenty chromatogramów w kierunku forward oraz odwrócone komplementarnie sekwencje reverse, utworzone za pomocą programu CodonCode Aligner. Porównanie sekwencji ampliconów dla odmiany 'Morex' oraz mutantu *rhl1.b*. (A) Chromatogramy potwierdzają obecność zmiany typu In/Del o długości 147 nukleotydów dla fragmentu MLOC_12900. (B) Chromatogramy potwierdzają obecność zmiany $A \rightarrow G$ w pozycji 181 fragmentu MLOC_56159. (C) Chromatogramy potwierdzają obecność zmiany $T \rightarrow G$ w pozycji 246 fragmentu MLOC_35776. (D) Chromatogramy potwierdzają obecność zmiany typu In/Del o długości 84 nukleotydów dla fragmentu MLOC_56157. Kolor zielony – adenina, czerwony – tymina, czarny – guanina, niebieski – cytozyna, czerwona strzałka – pozycja zmiany.

Tabela 10.16. Polimorficzne markery zidentyfikowane dla genotypów rodzicielskich populacji mapującej *rh11.b* x 'Morex'.

Nazwa markera	Genetyczna pozycja markera ¹	SNP ²	In/Del ³	Enzym ⁴	'Morex' ⁵	<i>rh11.b</i> ⁵	Referencje ⁶
3_0242	36,77	5	3	-	-	-	
1_1068	37,55	-	-	-	-	-	
2_0126	37,55	12	-	<i>NdeI</i>	501, 760	1261	
3_1305	40,96	1	-	<i>BstNI, PspGI</i>	408, 180	588	
2_1292	41,58	-	-	-	-	-	
1_0576	41,85	-	-	-	-	-	
1_0327	42,60	-	-	-	-	-	
1_0979	43,38	3	-	<i>BsmAI, BcoDI</i>	707, 193, 284	707, 193, 5, 379	GenomeZipper
3_0143	45,71	2	-	-	-	-	
2_1528	46,19	3	-	<i>SphI</i>	1195	475, 720	
2_1491	48,90	4	-	<i>MluI</i>	228, 57	285	
2_0357	49,68	-	-	-	-	-	
3_0752	53,60	2	-	-	-	-	
2_0074	54,37	2	-	<i>AluI</i>	285, 178, 53, 149, 23	285, 178, 202,23	
1_0772	54,37	4	-	<i>Esp3I</i>	1301	277, 1024	
3_0530	23,95	5	-	<i>BstEII</i>	811	361, 450	
2_0014	15,22	4	-	<i>BaeGI</i>	566	119, 447	
2_1460	18,49	-	-	-	-	-	
1_0959	58,57	-	-	-	-	-	
1_0403	61,32	1	-	-	-	-	Close i inni, 2009
2_1232	49,68	-	-	-	-	-	
3_0576	58,57	1	-	<i>ApaLI</i>	277, 406	683	
1_0327	42,60	3	1	<i>BstUI</i>	90, 667	757	

Tabla 10.16.c.d.

Nazwa markera	Genetyczna pozycja markera ¹	SNP ²	In/Del ³	Enzym ⁴	'Morex' ⁵	<i>rhl1.b</i> ⁵	Referencje ⁶
2_0113	56,81	1	-	-	-	-	
2_1326	49,68	2	-	<i>Hpy188III</i>	22, 188, 38	22, 188, 13, 25	Muñoz-Amatriaín i inni, 2011
2_0150	43,73	-	-	-	-	-	
GBS0759	32.7	7		<i>BspMI</i>	632, 615	542, 590, 657	Stain i inni, 2007
01208	81.05	-	-	-	-	-	
00460	74.96	1	-	-	-	-	
14397	68,791	-	-	-	-	-	GrainGenes, Rostoks i inni, 2005
17091	69,068	1	-	<i>XmaI, TspMI, AvaI</i>	578, 200	778	
00460	74,96	1	-	-	-	-	
1_1451	27.36	3	-	<i>EagI</i>	463	108, 355	GrainGenes,Hordeum-PilotOPA1-7H

¹ - Genetyczna pozycja markera odnosi się do mapy źródłowej (cM)

² - Liczba zmian typu SNP wykrytych w amplikonie

³ - Liczba zmian typu insercja/delecja wykrytych w amplikonie

⁴ - Enzym, który może zostać użyty w procedurze CAPS

⁵ - Spodziewana długość fragmentów uzyskana po trawieniu enzymem

⁶ - referencje odnoszą się wyłącznie do nazwy i genetycznej pozycji markera w opublikowanych mapach

Na czerwono oznaczono markery, które zostały wybrane do wstępnego typowania poszukiwanego interwału

Tabela 10.17. Poszukiwanie polimorficznych markerów dla genotypów rodzicielskich populacji, mapującej na podstawie mapy fizycznej zamieszczonej w bazie Ensemble Plants.

Kolejność ¹	Nazwa	Początek sekwencji (bp) ²	Koniec sekwencji (bp) ³	SNP ⁴	Del ⁵	Typ markera	Enzym ⁶	'Morex' ⁷	<i>rhll.b</i> ⁸	Sumaryczna długość zsekwencionowanych fragmentów
1	MLOC_7 5032	58965839	58976425	-	-	-	-	-	-	1519
3	MLOC_7 4942	58995829	58998118	2	-	CAPS	<i>MspI</i>	811	239, 572	2363
5	MLOC_7 484	59030603	59031757	4	-	CAPS	<i>BstNI</i>	748	398, 350	748
108	MLOC_3 6745	61755519	61761986	14	-	CAPS	<i>BshNI</i> (<i>BanI</i>)	797	401, 396	2333
227	MLOC_1 3768	63531226	63534872	4	-	CAPS	<i>BtsCI</i>	206, 627	833	1636
249	MLOC_9 943	64820794	64825489	-	-	-	-	-	-	1013
251	MLOC_3 6715	64839136	64840483	1	-	CAPS	<i>MvaI</i>	227, 606	833	833
311	MLOC_6 1880	66442756	66449286	3	1	In/Del	-	653	696	653
312	MLOC_1 1341	66481928	66485731	4	-	CAPS	<i>SspI</i>	977	503, 474	977
313	MLOC_6 2341	66485908	66492016	1	-	-	-	-	-	773
318	MLOC_1 8813	66540153	66544369	5	-	CAPS	<i>FspI</i>	810	577, 233	810
334	MLOC_7 5364	66926619	66929771	3	-	CAPS	<i>MnlI</i>	699	108, 591	699
341	MLOC_1 5404	67034822	67038961	2	1	CAPS	<i>MluCI</i>	343, 717	1060	1060

Tabela 10.17. c.d.

Kolejność ¹	Nazwa	Początek sekwencji (bp) ²	Koniec sekwencji (bp) ³	SNP ⁴	Del ⁵	Typ markera	Enzym ⁶	‘Morex’ ⁷	<i>rh11.b</i> ⁸	Sumaryczna długość zsekwencjonowanych fragmentów
346	MLOC_3 5776	67163982	67167116	5	-	CAPS	<i>Bst</i> MI	943	244, 699	2299
347	MLOC_5 940	67175341	67176694	16	2	CAPS	<i>Bst</i> UI	132, 153, 263, 294	285, 263, 294	2272
350	MLOC_3 9064	67198254	67199822	3	-	CAPS	<i>Mlu</i> CI	59, 684	102, 582, 260	2683
355	MLOC_3 8567	67230438	67232572	1	1	In/Del	-	70	65	3167
369	MLOC_3 6656	67348493	67350321	22	1	CAPS	<i>Bst</i> UI	289, 449	738	3029
374	MLOC_5 6155	67429877	67432510	5	1	CAPS	<i>Taq</i> I	653	445, 208	3568
375	MLOC_5 6157	67433344	67441064	33	2	In/Del	-	856	772	8181
376	MLOC_5 6159	67444224	67449501	13	-	CAPS	<i>Taq</i> I	45, 132, 110	45, 197	5686
377	MLOC_5 7064	67464667	67477448	3	-	-	-	-	-	1084
378	MLOC_4 434	67482264	67486821	27	1	CAPS	<i>Msp</i> I	174, 173, 481	347, 481	3056
379	MLOC_4 435	67487099	67490123	5	-	CAPS	<i>Mse</i> I	908, 88	996	2406
380	MLOC_5 8272	67509069	67510545	10	1	CAPS	<i>Eco</i> RI	844	375, 469	1469
383	MLOC_6 1391	67541490	67547114	8	-	CAPS	<i>Pst</i> I	533, 244	777	1376
384	MLOC_5 8719	67550160	67555655	2	-	CAPS	<i>Msl</i> I	50, 750	50, 297, 453	800

Tabela 10.17. c.d.

Kolejność ¹	Nazwa	Początek sekwencji (bp) ²	Koniec sekwencji (bp) ³	SNP ⁴	Del ⁵	Typ markera	Enzym ⁶	'Morex' ⁷	<i>rhII.b</i> ⁸	Sumaryczna długość zsekwencjonowanych fragmentów
387	MLOC_4 4331	67621924	67624184	2	-	CAPS	<i>ScaI</i>	602, 140	742	742
388	MLOC_6 2371	67635926	67640619	2	-	CAPS	<i>TaqI</i>	766	508, 258	766
389	MLOC_3 6826	67640720	67646441	-	1	In/Del	-	683	660	683
390	MLOC_7 0006	67667686	67668471	1	-	CAPS	<i>FspEI</i>	115, 375	490	490
402	MLOC_1 3217	67921078	67926525	-	-	-	-	-	-	1574
430	MLOC_8 2034	69711705	69716898	7	1	CAPS	<i>TaqI</i>	328, 531	328, 58, 470	859
503	MLOC_6 104	71668166	71669141	11	1	CAPS	<i>BstXI</i>	78, 454, 253	78, 707	1252
599	MLOC_5 9503	74844413	74849995	3	-	CAPS	<i>Tsp45I</i>	766	320, 446	1860
631	MLOC_1 0967	75686073	75693763	2	-	CAPS	<i>BstZ17I</i>	266, 403	669	2567
642	MLOC_1 1770	75976522	75983386	3	-	-	-	-	-	781
645	MLOC_1 8163	76225940	76229941	10	1	CAPS	<i>MwoI</i>	758	328, 430	900
673	MLOC_5 181	77876851	77882927	3	-	-	-	-	-	603
674	MLOC_1 4832	77884660	77888481	3	1	In/Del	-	631	642	631
719	MLOC_4 4139	81056752	81067292	2	-	-	-	-	-	698

Tabela 10.17. c.d.

Kolejność ¹	Nazwa	Początek sekwencji (bp) ²	Koniec sekwencji (bp) ³	SNP ⁴	Del ⁵	Typ markera	Enzym ⁶	'Morex' ⁷	<i>rhll.b</i> ⁸	Sumaryczna długość zsekwencjonowanych fragmentów
721	MLOC_1 2900	81093417	81095124	2	1	In/Del	-	731	878	878
1015	MLOC_2 0738	89432182	89435640	-	-	-	-	-	-	1537
1039	MLOC_7 0612	90428203	90432110	1	-	CAPS	<i>AgsI</i>	620	495, 125	620
1063	MLOC_7 7739	90773348	90775411	1	-	-	-	-	-	801
1078	MLOC_ 62557	91152635	91153644	-	-	-	-	-	-	770
1079	MLOC_3 8681	91203275	91208627	1	-	-	-	-	-	829
1082	MLOC_3 9145	91654325	91663246	-	-	-	-	-	-	765
1100	MLOC_5 4177	91664716	91668602	-	-	-	-	-	-	632
1117	MLOC_3 5169	91921874	91923505	4	-	CAPS	<i>BspI286</i> I	310, 90, 297, 119	310, 17, 72, 297, 119	816
1119	MLOC_2 4404	91940426	91943261	-	-	-	-	-	-	706
1120	MLOC_ 43495	92184238	92187230	-	-	-	-	-	-	794
1146	MLOC_5 2260	93257443	93260002	-	-	-	-	-	-	668
1170	MLOC_2 1648	94523824	94526644	-	-	-	-	-	-	874

Tabela 10.17. c.d.

Kolejność ¹	Nazwa	Początek sekwencji (bp) ²	Koniec sekwencji (bp) ³	SNP ⁴	Del ⁵	Typ markera	Enzym ⁶	'Morex' ⁷	<i>rhII.b</i> ⁸	Sumaryczna długość zsekwencjonowanych fragmentów
1203	MLOC_74692	96923046	96923798	2	2	In/Del	-	947	749	947
1390	MLOC_43743	106988290	106993579	2	-	-	-	-	-	657
1403	MLOC_59079	107886967	107891774	-	-	-	-	-	-	668
1518	MLOC_70690	111565353	111567834	2	-	CAPS	<i>BsrDI</i>	427, 477	903	900
1636	MLOC_65749	117906286	117912138	3	1	In/Del	-	658	687	687
1645	MLOC_21655	118183934	118187943	2	-	-	-	-	-	997
1656	MLOC_51348	118757147	118763872	2	-	CAPS	<i>BsiHKAI</i>	120, 620	740	740
1701	MLOC_64842	120053348	120064019	2	-	-	-	-	-	683
1713	MLOC_7820	120268979	120270295	-	-	-	-	-	-	602
1760	MLOC_66504	121307117	121309514	-	-	-	-	-	-	748
2253	MLOC_52332	136313164	136314932	1	-	-	-	-	-	959
2257	MLOC_63507	136397466	136406030	14	-	CAPS	<i>PstI</i>	972	278, 694	972
2918	MLOC_59092	158283767	158293851	-	-	-	-	-	-	614
3071	MLOC_71028	162957791	162962378	-	-	-	-	-	-	876

Tabela 10.17. c.d.

Kolejność ¹	Nazwa	Początek sekwencji (bp) ²	Koniec sekwencji (bp) ³	SNP ⁴	Del ⁵	Typ markera	Enzym ⁶	'Morex' ⁷	<i>rhl1.b</i> ⁸	Sumaryczna długość zsekwencjonowanych fragmentów
3094	MLOC_6 1712	163257403	163263046	-	-	-	-	-	-	682
3113	MLOC_1 5283	163642319	163649998	-	-	-	-	-	-	609

¹ – Kolejność genów według ich fizycznej pozycji w wybranym interwale obejmującym 105 962 853 pz; ^{2,3} – fizyczna pozycja markera według bazy *Ensembl Plants*; ⁴ – liczba zmian typu SNP wykrytych we wszystkich sekwencjonowanych fragmentach; ⁵ – liczba zmian typu insercja/delecja wykrytych we wszystkich sekwencjonowanych fragmentach; ⁶ – enzym, który może być użyty w procedurze CAPS; ^{7,8} – spodziewana długość fragmentów uzyskana po trawieniu enzymem. Na czerwono oznaczono markery wybrane do genotypowania populacji mapującej.

Tabela 10.18. Lista starterów stosowanych do sekwencjonowania genów kandydackich.

Nazwa markera		Fizyczna lokalizacja ¹		Starter forward	Starter reverse	Numer amplifikowanego fragmentu
MLOC ID ³	HORVU ID ⁴	Początek sekwencji [pz]	Koniec sekwencji [pz]			
MLOC_39064	HORVU7Hr1G030220	59281749	59405678	ACGGTACACGACGAAATCTCC	ACCCGCACTCCTGTTGTAAG	1
				CCCGCACTCCTGTTGTAAGT	TTGAGGTGGACAAGATGCCC	2
				GGTGAAGTCGTCCTCGTGTT	TGGCTTGCCATAAGTTCCA	3
				ATGTTGGGGAGATTCCAATG	TCTTGGTCATGCAATCCTACA	4
				TCTTAGGTCTCGTCAGGCCA	GCTGTTGCCTTGAGCCATG	5
MLOC_38567	HORVU7Hr1G030250	59304396	59307416	TTACGCAAACACCACAACGG	CGTTCGGCACTAGATCGGAG	1
				GCAGAAACGCGATCTAGAGG	TTTCTGACCATAGGCAAGTG	2
				ATTCCTCCGGTGTGAGTGAG	ATTTGTGTCAAGCACCACCA	3
				TGTGGCCTATTTTACAGGGTCT	GGGAAAGAATAGCGGGAAAG	4
				ACCCTCTCCCTAGGTTCTCG	GTCGGCTTTACCAGGATTCA	5
				CGAAGCCGACTTGAATCCTGG	CACAGGTGCATGCAAGTTCGT	6
				ACCTGTGCGAACTACGATCC	CCTGCGTTTCCCATCGACC	7
				CGCTACGCTATGCTATGCTATG	GGGAGAGATTCTGGCTTTC	8
				¹ TGAAAGCCAGGAATCTCTCC	¹ CAGAAGCAGGGAAACACAGA	9
				TTGGATTGTTGATTGCAGAGA	GTGGTGGCGGAGGAGATG	10
				**GATGATGGAGGAGGACATGG	**CTCGCAACTAATCACCAGCA	11
				CAAAGCCAGCACCCGTTT	TGGAGGAAGTCGTGGTAAGC	12
				*TGCCTAAAGACGATGAACACA	*CCTCTGACCCTGTTGCTTGT	13
ACAGGTGCGATGATGGTGT	TCGCTTAGGTAGGCATTGAGA	14				

¹- sekwencje starterów użytych w procedurze EcoTILLING w celu analizy segregacji mutacji A→T zidentyfikowanej pomiędzy mutantem *rhl1.b* a odmianą 'Karat'.

*- zastosowano reagenty Maxima Hot Start PCR Master Mix (Thermo Scientific)

Tabela 10.18. c.d.

Nazwa markera		Fizyczna lokalizacja ¹		Starter forward	Starter reverse	Numer amplifikowanego fragmentu
MLOC ID ³	HORVU ID ⁴	Początek sekwencji [pz]	Koniec sekwencji [pz]			
MLOC_17531	HORVU7Hr1G030270	59574895	59578109	*TTTAGTCCCGGCCAGAG	*CATTGTTACTGAGGCATTGTCA	1
				*AAGGCCCGTTTCCACTA	*AGACGAAGACCCGCACAG	2
				CGTTCTCCCTCGAACAGAGT	CGGATGACGCCCAACATAGA	3
				TCTATGTTGGGCGTCATCCG	ACAGTGGCAGGTTAGAGTTGG	4
				TCCAACCTAACCTGCCACTG	AAGCCAAGTGAGTCTGCCAA	5
				GCAGACTCACTTGGCTTAC	GGCTAGGACGCTGGATCTCT	6
				*TGTTTCCCGACTTCATTC	*AATGTGGTGTCCCTTCTGG	7
MLOC_36656	HORVU7Hr1G030280	59708784	59710757	ATGCGAGGGAGTTGCATGAT	CAAACAACAGTACGGGGTGC	1
				TGCACCCCGTACTGTTGTT	AACGGTAATTCAGGAGGACTCA	2
				*AATTTTGGTGGATTGGTGGA	*ACCCCTTGTGGAGACATGAG	3
				GACGGGCTTCAGGATTATGC	ATACCAAGCGAGGTTTCAGAGT	4
				TCATGTGAGTTCTGGCAAGG	TCGAGACCCTCTGATCGAAT	5
MLOC_75365	HORVU7Hr1G030290	59712810	59715186	*TAGCGTGTCTCTGATGG	*CCAGCTTGCTTATTCC	1
				ACCCACCTACGGGAATAAGC	GATGGTCTCGTGCCTGATCT	2
				TGGAGCTGAACAAGATGGTG	TCCTCCTCGTCGTAGTCCTC	3
				GTCGGAGATCAGGCACGAG	GGGACACGAGCTTTGCGG	4

*- zastosowano reagenty Maxima Hot Start PCR Master Mix (Thermo Scientific)

Tabela 10.19. Warunki przygotowania prób w celu sekwencjonowania genów kandydackich. Numery fragmentów podano zgodnie z tabelą 10.18.

Identyfikator genu		Numer amplifikowanego fragmentu	Temp. przyłączenia staterów	Liczba cykli PCR
MLOC	HORVU			
MLOC_39064	HORVU7Hr1G030220	1	58°C	28
		2	60°C	32
		3	59°C	28
		4	60°C	33
		5	60°C	33
MLOC_38567	HORVU7Hr1G030250	1	58°C	33
		2	60°C	33
		3	61°C	32
		4	61°C	32
		5	61°C	32
		6	68°C	2
			52°C	3
			58°C	29
		7	68°C	2
			52°C	3
			58°C	29
		8	56°C	32
9	58°C	32		
10	58°C	32		
11	68°C	2		
	62°C	3		
12	60°C	29		
	58°C	32		
MLOC_38567	HORVU7Hr1G030250	13	68°C	2
			62°C	3
60°C	29			
14	58°C	33		
MLOC_17531	HORVU7Hr1G030270	1	60°C	33
		2	60°C	33
		3	58°C	33
		4	58°C	33
		5	58°C	33
		6	58°C	33
		7	60°C	33
MLOC_36656	HORVU7Hr1G030280	1	56°C	35
		2	56°C	36
		3	58°C	36
		4	60°C	36
		5	56°C	36
MLOC_75365	HORVU7Hr1G030290	1	58°C	36
		2	56°C	36
		3	58°C	33
		4	58°C	33

Tab. 10.20. Lista starterów stosowanych do reakcji qPCR dla genów. Kolorem pomarańczowym oznaczono gen kandydacki kodujący czynnik transkrypcyjny z domeną bHLH.

MLOC ¹	HORVU ²	Prawdopodobny produkt białkowy	Starter forward	Starter reverse
MLOC_21703	HORVU7Hr1G081740	endotransglikozylaza ksyloglukanu	CACCATCTACGACTACTGCG	TACTGTTCCATGTTCGCACTC
MLOC_60217	HORVU2Hr1G097490	ekspansyna	GCAAGTACAACGGGATGAAC	TCAGCACGGAGAGGTAGAAC
MLOC_4597	HORVU2Hr1G081920	białko z powtórzeniami diesteroglicerofosforylowymi, podobne do fosfodiesterazy i zawierające kotwicę glikozylofosfatydyloloinozytolową / możliwy ortolog genu SHAVEN3 (SHV3);	CAGCAAACGAAGTACGACCT	AACAGAGCTGGTTTCGACAG
MLOC_74876	HORVU4Hr1G062120	RhoGTPase GDP / możliwy ortolog genu <i>SCN1(SUPERCENTIPEDE1)</i>	GAAAGAAAGAAGGGCTCTGC	CAGTGTCAAATTCCCAGTCC
MLOC_75055	HORVU7Hr1G119340	ekspansyna	ATGATTGACATGCAGCCCC	TCCTTGACGAAAGCTACGC
brak	HORVU7Hr1G046210	arabinogluktan	ATCCGGGCTATAAGACTCCCTCT C	ATTTGTGCCCTTGATGCTTGC G
MLOC_38567	HORVU7Hr1G030250	czynnik transkrypcyjny z domeną bHLH	GGAGGATCAATGTTCGGGGCAGA	ACGTTCGGCGATGCTGTGCGG

¹ - Identyfikator MLOC - identyfikator genu zgodnie z wersją genomu jęczmienia 082214v1; ² - Identyfikator HORVU - identyfikator genu według wersji genomu jęczmienia Hv_IBSC_PGSA_v2

Rycina 10.4. Porównanie sekwencji pomiędzy odmianą ‘Karat’, siostrzanymi bezwłośnikowymi mutantami.

```

KARAT      GCGTCGACGTGGAATGAAATCAGGCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGGCGGG
rh11.a    GCGTCGACGTGGAATGAAATCCTGCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGGCGGG
rh11.c    GCGTCGACGTGGAATGAAATCCTGCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGGCGGG
rh11.b    GCGTCGACGTGGAATGAAATCCTGCGAACAGCAGCGCGAAGAGCAGCAACGGCGGGCGGG
*****
    
```

Tabela 10.21. Lista numerów akcesyjnych dla białek rodziny bHLH Arabidopsis, wraz z ich klasyfikacją do podrodzin według Heima (2003), które zostały użyte aby skonstruować drzewo filogenetyczne.

AGI kod	Identyfikator białka	Podrodzina	AGI kod	Identyfikator białka	Podrodzina
At3g61950	NP_567121.1	Ia	At4g29930	NP_194722.2	IIIc
At3g24140	NP_189056.2		At4g16430	NP_193376.1	IIId
At2g46810	NP_001324834.1		At1g01260	NP_171634.1	
At5g46690	NP_568666.1		At2g46510	NP_566078.1	
At4g01460	NP_192055.1		At4g00870	NP_567195.1	IIIe
At5g65320	NP_201335.1		At1g32640	NP_174541.1	
At1g72210	NP_177366.1		At4g17880	NP_193522.1	
At1g22490	NP_564171.1		At5g46760	NP_199488.1	
At5g53210	NP_200133.2		At5g46830	NP_199495.1	IIIff
At3g06120	NP_187263.1		At4g09820	NP_192720.2	
At1g49770	NP_175399.2		At4g00480	NP_191957.2	
At1g12540	NP_172715.4	At5g41315	NP_001332705.1	IVa	
At1g62975	NP_683462.1	At1g63650	NP_176552.1		
At4g25410	NP_001320062.1	At2g227700	NP_850031.2	IVb	
At4g25400	NP_194270.2	At2g22760	NP_179861.2		
At5g51790	NP_199992.2	At2g22750	NP_001324634.1		
At5g51780	NP_199991.1	At4g37850	NP_195498.3	IVc	
At2g41240	NP_850349.1	At3g47640	NP_190348.1		
At5g04150	NP_196035.2	At4g36060	NP_849566.1	IVd	
At3g56970	NP_191256.1	At3g19860	NP_001326099.1		
At3g56980	NP_191257.1	At5g54680	NP_200279.1	IVe	
At2g31210	NP_180679.2	At1g51070	NP_175518.1		
At2g31220	NP_001318326.1	At3g23210	NP_001327796.1		
At1g06170	NP_172107.1	At4g14410	NP_849383.1	IVf	
At4g21330	NP_193864.1	At5g56960	NP_200506.1		
At2g28160	NP_850114.1	At5g43650	NP_568589.1	Va	
At2g16910	NP_179283.2	At1g69010	NP_177064.1		
At5g65640	NP_569014.1	IIIb	At5g08130	NP_001119190.1	

Tabela 10.21. c.d.

At5g10570	NP_196619.1		At1g68810	NP_564944.1	Vb
At1g12860	NP_172746.2		At3g25710	NP_189199.1	
At3g26744	NP_189309.2		At3g56770	NP_191236.1	
At1g10610	NP_001321652.1	IIIc	At2g41130	NP_181646.1	XI
At1g68240	NP_176991.2		At4g30980	NP_001320095.1	
At1g25310	NP_173902.1		At2g24260	NP_180003.1	
At3g59060	NP_851021.1	VIIa	At5g58010	NP_200609.1	
At2g43010	NP_001323426.1		At1g03040	NP_563672.1	
At1g09530	NP_172424.1		At4g02590	NP_567245.1	
At4g28800	NP_001320084.1		At1g25300	NP_564229.1	XII
At4g28815	NP_001078463.1		At1g73830	NP_177524.2	
At4g28811	NP_001078462.1		At1g18400	NP_173276.2	
At4g28790	NP_001320083.1		At4g34530	NP_195179.2	
At2g20180	NP_001189559.1		At1g68920	NP_177058.1	
At2g46970	NP_182220.2		VIIb	At1g26280	
At3g62090	NP_001078329.1	At5g48560		NP_199667.1	
At1g02340	NP_001323315.1	At3g07340		NP_187390.1	
At1g02340	NP_001323315.1	VIIIb	At1g10120	NP_172483.4	
At5g61270	NP_200935.2		At3g23690	NP_189011.2	
At4g00050	NP_191916.3		At2g42300	NP_850368.1	
At5g67110	NP_201512.1		At3g57800	NP_850745.1	
At4g63930	NP_568010.1		At1g59640	NP_849829.1	
At3g22100	NP_188848.1	VIIIa	At5g62610	NP_201067.1	
At1g30670	NP_174355.1		At4g36540	NP_195372.1	
At2g34820	NP_181028.2		At2g18300	NP_849976.1	
At3g21330	NP_188770.1	VIIIb			
At5g67060	NP_201507.1				
At3g50330	NP_190602.1				
At5g09750	NP_196537.1				
At4g00120	NP_191923.1				
At1g27740	NP_564293.1	VIIIc			
At2g14760	NP_001189527.1				
At4g33880	NP_195114.2				
At1g66470	NP_176820.1				
At5g37800	NP_198596.1				
At2g42280	NP_181757.2	IX			
At1g05805	NP_563749.1				
At2g43140	NP_973670.1				
At1g51140	NP_564583.1				
At4g09180	NP_192657.1				
At1g354460	NP_174776.1				
At3g19500	NP_566639.1	X			
At3g20640	NP_188700.1				

Tab. 10.22. Lista numerów akcesyjnych dla białek rodziny bHLH Arabidopsis, wraz z ich klasyfikacją do podrodzin według Toledo-Ortiz (2003).

Identyfikator białka	Podrodzina			
AAF79643	1	BAB08920	8	
AAF75809		CAA17131		
NM118673		BAA25078		
NM118672		AAF97322		
NM124557		BAA97217		
AAC78547	2	BAA97365	9	
CAB72167		CAB43668		
CAB72168		AAC98450		
NM120497		AAF78492		
CAB71902	3	NM113586		9
CAB77716		CAB89386		
AAC33499		NM125962		
BAB01355		AAC64222		
AAG51804		CAB79132		
NM102098		AAD39586		
NM124039		CAB80472		
BAB11554		AAF07352		
BAB09783	4	BAA95758	10	
AAF30305		CAC00740		
AAD20667		AAD11998		
AAF80214	4	AAF07356	11	
AAD20666		CAB93714		
AAC63587	5	BAB08642	12	
AAC63588		AAF24944		
AAC63586		CAB79668		
CAB38933		BAA99700		
BAA97026		CAA20199		
BAB09934	6	BAB02240		
AAG50538		AAD21412		
BAA95734		CAB81059		
CAB78483		AAF98179		
AAL55718		AAF15922		
NM112876	7	BAB09865	13	
NM114632		CAC05472		
AAB72192		AAG52051		
BAB08503		BAB10287		

Tab. 10.22. c.d.

CAB81011		AF428350	18
BAA94988		AAC34336	
AAF63634	14	AAG27834	19
AAF26082		BAB10359	
AAB63827		AAF24948	
AAF87154		CAA19870	
AAK15282		NP201507	
BAB10945		CAB89355	
CAB80359		CAB80770	
AAC33213		BAB03046	
AAD24380		CAB81914	
AAD22130		AAC12822	
CAB86934	15	AAD25754	
CAA22971-1			NM102341
CAA22971-2		AAG13058	21
CAB81467		BAB11628	
CAB80763			
BAB08482			
AAC34226			
BAC10690			
AAB88652			
AAG50543			
AAG12608	16		
CAB78042			
AAC64303			
AAF29386			
AAD25805			
CAB80752			
CAA18195	17		
AAD03387			
BAA97525			
AAF24852			
AAF25996			
NP_564229			
AAD15506			
CAB80320			
BAA97208	18		
AAF07355			
AAG29214			
CAA18832			
AAF02164			
BAB10689			
BAB01846			

Tab. 10.23. Dostępny białek bHLH jęczmienia, ryżu i *Lotus japonicus*, które zostały użyte skonstruować drzewo filogenetyczne.

Nazwa genu	Gatunek	Identyfikator białka	Źródło	Referencje
<i>Hvrh1</i>	barley	n/a	n/a	b.d.
n/a	barley	A0A287VYJ5	InterPro	b.d.
n/a	barley	A0A287VYP1	InterPro	b.d.
n/a	barley	A0A287VYQ6	InterPro	b.d.
n/a	barley	A0A287VZA4	InterPro	b.d.
n/a	barley	A0A287VYN6	InterPro	b.d.
<i>Osrh1</i>	rice	BAD72512.1	NCBI	Ding i inni, 2009
n/a	rice	BAD35276.1	NCBI	b.d.
n/a	rice	BAD29274.1	NCBI	b.d.
n/a	rice	AAP44685.1	NCBI	b.d.
<i>Ljrh1</i>	lotus	ACP28172.1	NCBI	Karas i inni, 2009

11. Wykaz skrótów

AFLP – Amplified fragment length polymorphism
APS – Ammonium Per Sulfate
BC – Backcross
bHLH – basic Helix-Loop-Helix
brb – *bald root barley*
BSA – Bulk Segregant Analysis
CAPS – Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
Cly1 – *Cleistogamy 1*
COW1 – *CAN OF WORMS1*
CPC – *CAPRICE*
C-TAB – hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide
DH – Doubled Haploids
EGL3 – *ENHANCER OF GLABRA3*
EST – Expressed Sequence Tags
ETC1 – *ENHANCER OF TRYI CPC1*
EXO70A1 – *EXOCYST SUBUNIT EXO70 FAMILY PROTEIN A1*
GL2 – *GLABRA2*
GL3 – *GLABRA3*
HRM – High Resolution Melting
HvPRX45 – *PEROXIDASE 45*
HvSGRA – *Hordeum Vulgare Stage Green-Revertible Albino*
InDel – Insertions Deletions
JKD – *JACKDAW*
LINE – Long Interspersed Nuclear Elements
LjLRL – *LOTUS JAPONICUS ROOTHAIRLESS1-LIKE*
LOD – Logarithm of the Odds
LTR – Long Terminal Repeats
Mla – *Mildew resistance locus a*
mlo – *mildew resistance locus o*
NCBI – National Center for Biotechnology Information
NIL – Near Isogenic Lines

OsCSLD1 – *Oryza sativa* cellulose synthase-like D1
OsEXPB5 – *Oryza sativa* Beta-expansin-5
OsFHI – *Oryza sativa* Formin Homology1
Osrhl1– *Oryza sativa* root hairless 1
OsSNDP1 – *Oryza sativa* Sec14-Nodulin Domain-Containing Protein 1
OsXXT1– *Oryza sativa* XYG XYLOSYL TRANSFERASE
PCR – polymerase chain reaction
PEV – Position Effect Variegation
RAPD – Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism
RHD4 – *ROOT HAIR DEFECTIVE4*
RHD6 – *ROOT HAIR DEFECTIVE6*
rhl1 – *root hairless 1*
rhp1– *root hair primordia 1*
RIL – Recombinant Inbred Lines
ROS – Reactive Oxygen Species
RSL – *ROOT HAIR DEFECTIVE SIX-LIKE*
RTF – Replication Termination Factor
rym4 / rym5 – *resistance to yellow mosaic 4 / 5*
SCM – *SCRAMBLED*
SHV3 – *SHAVEN3*
SNP – Single Nucleotide Polymorphism
SSNC – Second Site Noncomplementation
SSR – Simple Sequence Repeats
STS – Sequence-Tagged Site
TBE – Tris/Borate/EDTA
TEMED – TEMED –N,N,N',N'-TEtraMethylEthyleneDiamine (N, N, N',N'-Tetra Metylo Etyleno Dwuamina)
TILLING – Targeting Induced Local Lesions IN Genomes
TRY – *TRYPTICHON*
TTG1 – *TRANSPARENT TESTA GLABRA1*
VRN3 – *Vernalization-3*
WER – *WEREWOLF*