

Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych

w Słupi Wielkiej

Joanna Dziurdziak

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**Charakterystyka zmienności genetycznej
wybranych obiektów *Hordeum vulgare* L.**

Description of genetic variation in specific *Hordeum vulgare* L. accessions

Promotor:

dr hab. Maja Boczkowska, prof. Instytutu

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB

Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych

Promotor pomocniczy:

dr Małgorzata Targońska – Karasek

Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny

Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej w Powsinie

Recenzenci:

Dr hab. Hanna Bolibok- Brągoszewska, prof. SGGW

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

Dr hab. Edyta Paczos-Grzęda, prof. Uczelni

Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Radzików, 2022

PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. Dziurdziak Joanna, Bolc Paulina, Włodarczyk Sylwia, Puchta Marta, Gryziak Grzegorz, Podyma Wiesław, Boczkowska Maja (2020) Multifaceted Analysis of Barley Landraces Collected during Gene Bank Expeditions in Poland at the End of the 20th Century. *Agronomy* 10: 1958, <https://doi.org/10.3390/agronomy10121958>
2. Dziurdziak Joanna, Gryziak Grzegorz, Groszyk Jolanta, Podyma Wiesław, Boczkowska Maja (2021) DArTseq Genotypic and Phenotypic Diversity of Barley Landraces Originating from Different Countries. *Agronomy* 11: 2330, <https://doi.org/10.3390/agronomy11112330>
3. Dziurdziak Joanna, Wiesław Podyma, Henryk Bujak, Maja Boczkowska. (2022) Tracking Changes in the Spring Barley Gene Pool in Poland during 120 Years of Breeding. *International Journal of Molecular Sciences* 23, no. 9: 4553. <https://doi.org/10.3390/ijms23094553>

WPROWADZENIE

Hodowla jęczmienia jarego w Polsce liczy ponad 120 lat, a za początek uważa się powstawanie pierwszych zakładów hodowlanych pod koniec XIX wieku. Komponentami wyjściowymi dla późniejszych odmian były wyselekcjonowane materiały z Niemiec a później z Moraw (obecnie Czechy) (Arseniuk i in. 2003). Już w 1902 roku wprowadzono pierwsze techniki hodowlane takie jak: udoskonalanie odmian już istniejących przez selekcję, wyszukiwanie i utrwalanie nowych typów odmian, krzyżowania oraz aklimatyzację (Sempołowski, 1902). W późniejszych okresach do krzyżowań wykorzystywano dobrze plonujące odmiany zagraniczne oraz polskie komponenty rodzicielskie (Arseniuk i in. 2003). Ciągły wzrost w powstawaniu nowych odmian jęczmienia jarego, doprowadził do stopniowego zwiększania powierzchni upraw tego gatunku nie tylko w Polsce, ale również na świecie (Słaboński, 1972). Stare odmiany były wypierane przez nowe, lepiej plonujące, radzące sobie w różnych warunkach środowiskowych, z większą odpornością na wyleganie i różne patogeny. Przypuszcza się,

że stała, ukierunkowana selekcja znacznie zawężyła pulę genową uprawianych gatunków zbóż (Gepts, 2003; Plucknett i in., 2014).

Postępująca erozja genetyczna ekosystemów rolniczych i związana z nią utrata bioróżnorodności stała się zjawiskiem powszechnym (Veteläinen i in., 2009). Lista czynników powodujących wzrost erozji i zmniejszenie puli genowej we współczesnych uprawach jest duża. Są to między innymi zmiany w kulturze rolnej, migracja ludzkości do miasta a także globalne ocieplenie (FAO, 2017). Uważa się, że jednym z kluczowych źródeł zmienności genetycznej są odmiany miejscowe, które cechują się dużymi zdolnościami adaptacyjnymi do lokalnych warunków środowiskowych, co stanowi wysoki potencjał hodowlany ukryty w bankach genów (Marone i in., 2021).

Kolekcja rodzaju *Hordeum* zgromadzona w przechowalni długoterminowej Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych (KCRZG) w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowym Instytucie Badawczym w Radzikowie liczy prawie siedem tysięcy obiektów, z czego 99% stanowi jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.). W skład kolekcji wchodzi obiekty pochodzące z 54 krajów z różnych części świata, o zróżnicowanym statusie biologicznym, w tym linie hodowlane, materiały badawcze, odmiany hodowlane oraz odmiany miejscowe.

CELE BADAŃ

Cele główne

1. Charakterystyka puli genowej populacji miejscowych i odmian hodowlanych jęczmienia jarego zgromadzonych w kolekcji Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych.
2. Podniesienie świadomości społeczności naukowców i hodowców w zakresie potencjału zgromadzonej kolekcji obiektów jęczmienia jarego i zwiększenie zainteresowania wykorzystaniem zasobów genowych w pracach badawczych i rozwojowych.

Cele szczegółowe

1. Aktywizacja danych historycznych jęczmienia jarego zgromadzonych w bazie danych EGISSET.
2. Identyfikacja obiektów jęczmienia jarego o wysokiej odporności na patogeny i zróżnicowanym tle genetycznym.

3. Ocena zmienności genetycznej wewnątrz i między obiektami jęczmienia jarego w kolekcji KCRZG.
4. Porównanie efektywności markerów ISSR i SNP uzyskanych w trakcie analizy DArTseq do oceny zróżnicowania kolekcji zasobów genowych jęczmienia jarego.
5. Ocena zmian w puli genowej w trakcie 120 lat hodowli jęczmienia jarego w Polsce.
6. Identyfikacja i weryfikacja duplikatów w kolekcji jęczmienia jarego przechowywanej w KCRZG.
7. Identyfikacja regionów genomu, w których widoczne są zmiany będące efektem hodowli.

Hipotezy badawcze:

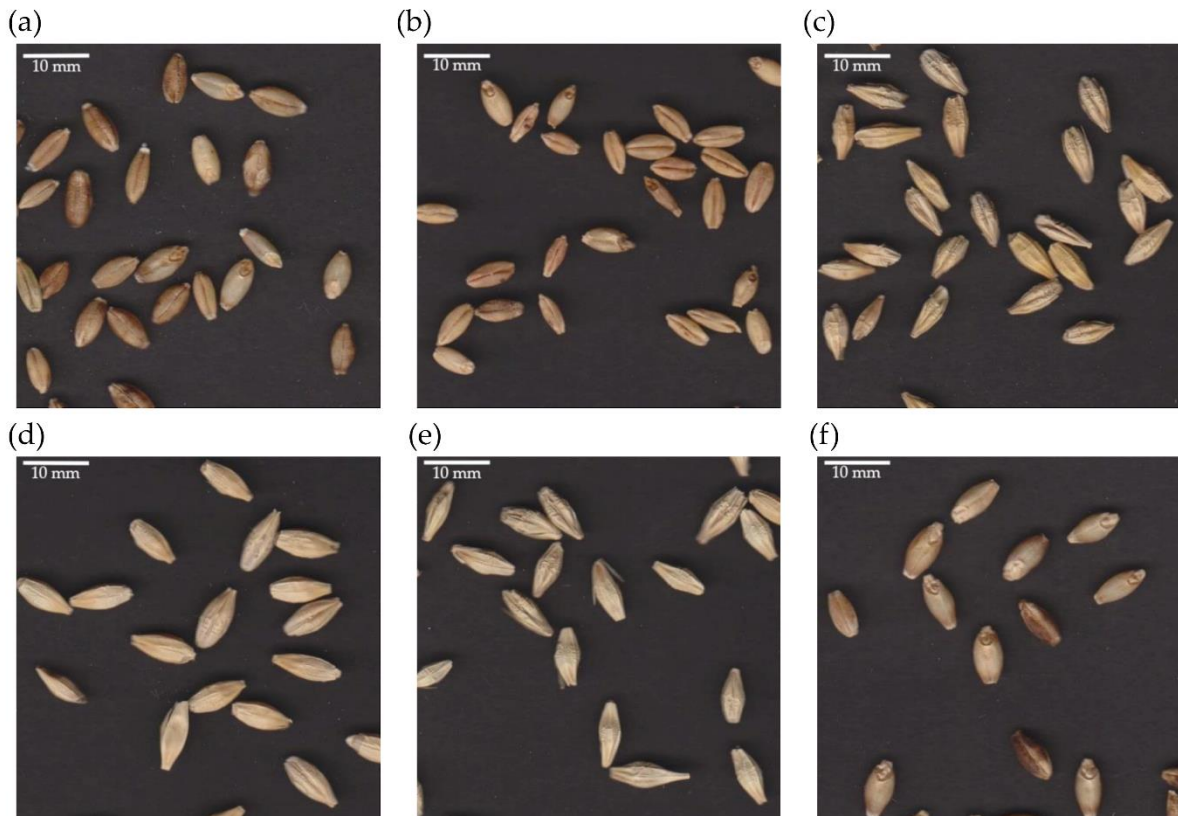
- Poziom zmienności genetycznej jęczmienia jarego ulega obniżeniu wraz z postępem hodowlanym.
- Formy wielorzędowe jęczmienia jarego wykazują odrębność genetyczną od form dwurzędowych.
- Odmiany miejscowe jęczmienia jarego z różnych rejonów świata reprezentują odrębne pule genowe.
- Pula genowa odmian historycznych jęczmienia jarego nie jest reprezentowana we współczesnych odmianach.
- W kolekcji jęczmienia jarego przechowywanej w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych występują duplikaty, które można zidentyfikować jedynie na podstawie analiz molekularnych.
- Wyniki analizy zmienności genetycznej uzyskiwane przy użyciu różnych systemów markerowych wykazują niski poziom korelacji.

WYNIKI BADAŃ

W publikacji Dziurdziak i in. (2020) pt. „Multifaceted analysis of barley landraces collected during gene bank expeditions in Poland at the end of the 20th century” przedstawiono charakterystykę zróżnicowania genetycznego dla 64 odmian miejscowych jęczmienia jarego zdeponowanych w Banku Genów Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych IHAR-PIB w Radzikowie. Obiekty te zostały zebrane podczas ekspedycji terenowych odbywających się na terenie Polski w drugiej połowie XX wieku. Zmienność oceniano na podstawie danych

paszportowych, historycznych danych z doświadczeń polowych, morfometrii ziarniaków oraz analizy genetycznej bazującej na markerach ISSR.

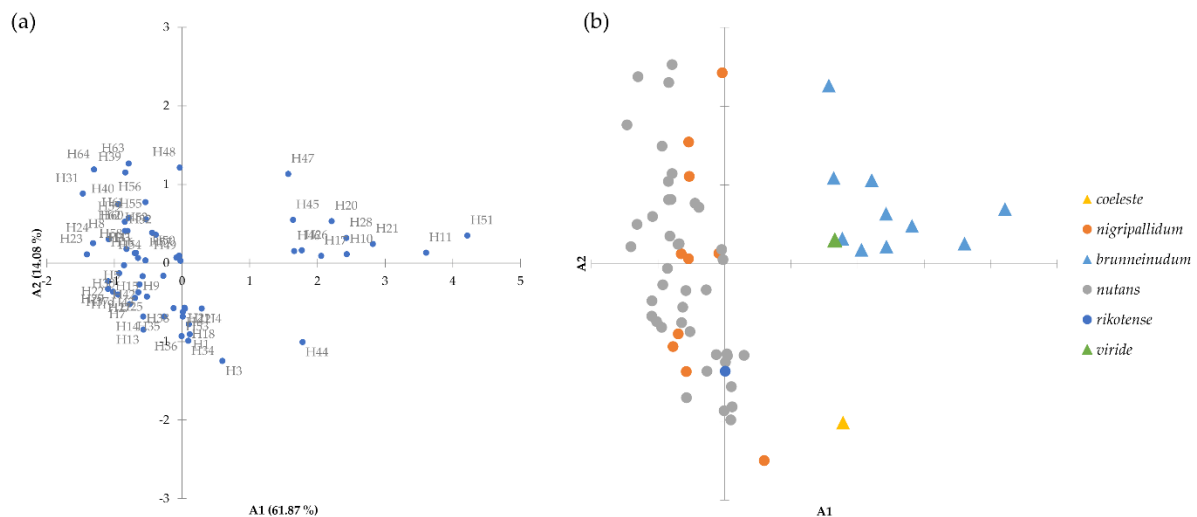
Dane paszportowe, pozwoliły stwierdzić, że badane obiekty reprezentowały sześć odmian botanicznych według klasyfikacji Mansfelda (Mansfeld i in., 1950) tj. *brunneinudum*, *coeleste*, *nigripallidum*, *nutans*, *rikotense* i *viride* i pochodziły głównie z południowej i południowo-wschodniej Polski.



Rys. 1 Zdjęcia ziarna reprezentujące odmiany botaniczne jęczmienia: a) *brunneinudum* (41266); b) *coeleste* (41867); c) *nigripallidum* (40070); d) *nutans* (41282); e) *rikotense* (42389); f) *viride* (41869).

Wśród 12 badanych cech morfologicznych i fenologicznych ocenianych w trzyletnich doświadczeniach polowych największy stopień zróżnicowania wykazała odporność na wyleganie (czyli 65%), a najmniejszą odporność na rynchosporiozę (4%). Analiza wariancji ANOVA przeprowadzona dla sześciu parametrów opisujących morfometrię nasion wykazała istotne statystycznie różnice ($p < 0,05$) tylko w przypadku klasyfikacji na podstawie odmiany botanicznej i obecność lub brak plewki. Grupę obiektów posiadających nieoplewione ziarniaki wyodrębniły również analiza skupień przeprowadzona metodą Warda na podstawie współczynnika Gowera oraz analiza składowych głównych PCA.

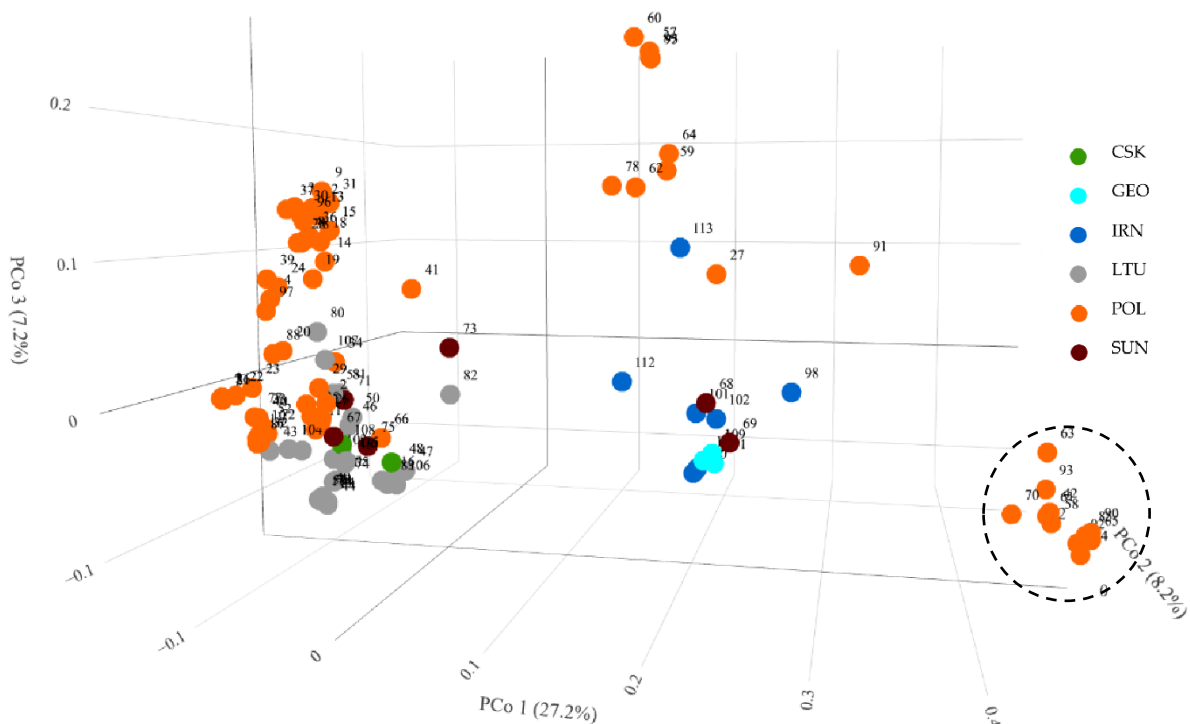
Analiza genetyczna wykazała obecność znaczącej liczby fragmentów o wysokiej frekwencji co wskazuje na znaczny udział wspólnego łała genetycznego w badanych obiektach i przekłada się na stosunkowo niewielką zmienność wewnętrzną kolekcji ($u_{He} = 0,185$). Wszystkie przeprowadzone analizy danych wykazały obecność wśród badanych obiektów trzech grup i powiązanie ich genotypu z odmianami botanicznymi oraz z cechą morfologiczną ziarna, czyli oplewieniem (Rys. 2). Uzyskane wyniki nie wykazały istnienia istotnego związku między genotypem a miejscem pochodzenia lub warunkami środowiskowymi. Można więc przypuszczać, że w przypadku polskich odmian miejscowych jęczmienia presja selekcyjna środowiska nie odegrała znaczącej roli w ich powstaniu. Interesującym faktem jest, że obiekty zebrane w tej samej lub zbliżonej lokalizacji wykazywały znaczne zróżnicowanie morfologiczne, tj. reprezentowały różne odmiany botaniczne, co świadczy o uprawie odmian dwu- i sześciorzędowych z nasionami oplewionymi bądź nagimi w bliskiej odległości od siebie. Obiekty te wykazywały podobny poziom i spektrum odporności na patogeny przy jednoczesnym niskim podobieństwie genetycznym. Może to wskazywać na obecność różnych genów/alleli determinujących odporność na choroby. W obrębie badanej kolekcji, nie zaobserwowano, opisywanego w literaturze, podziału na formy dwu- i wielorzędowe, natomiast wyraźnie wyodrębniła się grupa obiektów o ziarnie pozbawionym plewki. Z dostępnych danych literaturowych wynika, że odmiany jęczmienia jarego o ziarnie nagim mają wyższą tolerancję na niskie temperatury, ale są też mniej odporne na choroby i słabiej plonują.



Rys. 2. Wyniki uogólnionej analizy Prockusta danych genotypowych i morfologicznych ziarna 64 polskich odmian miejscowych jęczmienia jarego: (a) Wykres wyników dla pierwszej i drugiej osi z oznaczeniem numerów porządkowych obiektów; (b) Wykres wyników dla pierwszej i drugiej osi z oznaczeniem odmiany botanicznej. Ziarno pozbawione łuski oznaczono trójkątem, a oplewione kropką.

W drugiej publikacji pt. „DARtseq Genotypic and Phenotypic Diversity of Barley Landraces Originating from Different Countries.” Kontynuowano charakterystykę zróżnicowania genetycznego kolekcji jęczmienia jarego przechowywanej w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych. W stosunku do pierwszej publikacji, materiał rozszerzono o pozostałe odmiany miejscowe pochodzące z Polski i odmiany miejscowe z innych rejonów geograficznych tj., dawnego ZSRR i Czechosłowacji, Gruzji, Iranu oraz Litwy. Ocenę zróżnicowania tego materiału przeprowadzono na podstawie danych paszportowych, historycznych danych charakterystyki i oceny, morfometrii nasion oraz analizy genetycznej bazującej na wykrywaniu różnic w sekwencji DNA – metodą DARtseq.

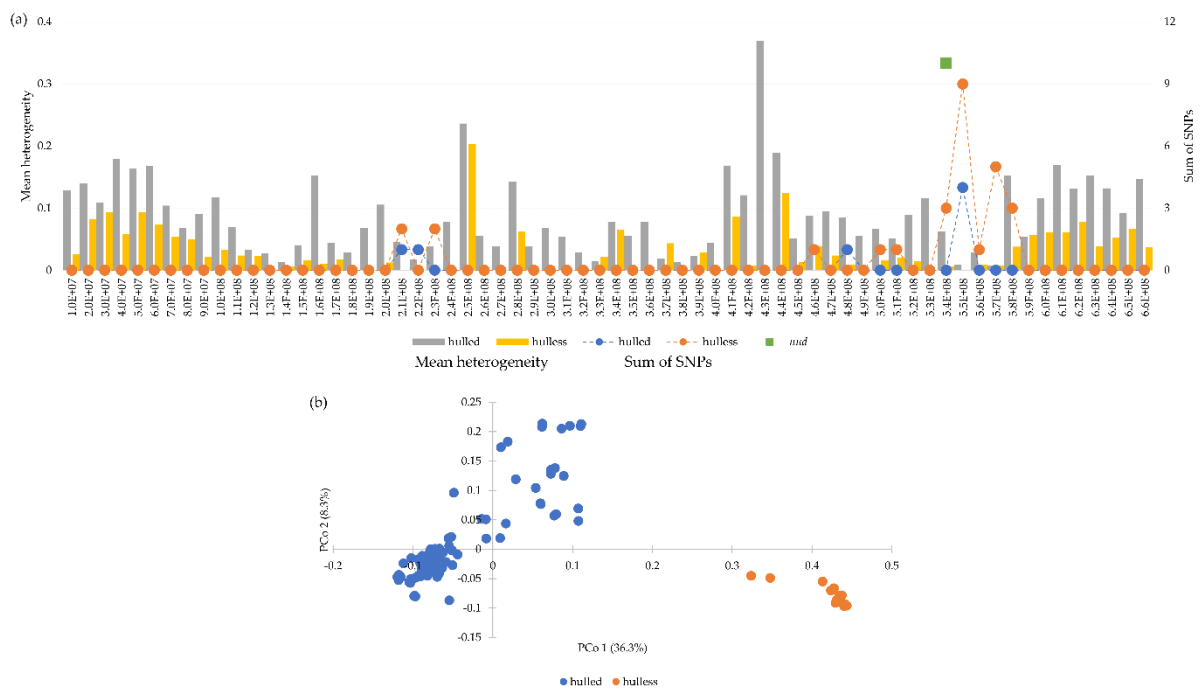
Średnia wartość współczynnika zmienności wskazywała na przeciętną zmienność genetyczną badanej kolekcji wynoszącą 0,232. Analiza wariancji molekularnej AMOVA wykazała, że zaledwie 15% zmienności genetycznej może mieć związek z miejscem występowania odmiany miejscowej, czyli krajem pochodzenia (Rys. 3). Wszystkie przeprowadzone w tej pracy analizy, wyodrębniły grupę nieoplewionych obiektów, co pokrywa się z wynikami uzyskanymi w omówionej powyżej publikacji.



Rys. 3 Wyniki analizy głównych współrzędnych (PCoA) dla 116 odmian miejscowych jęczmienia jarego z zaznaczeniem kraju pochodzenia. Obiekty o ziarnie nieoplewionym obwiedziono przerywaną linią.

Dzięki zmapowaniu odczytów DARtseq do genomu referencyjnego jęczmienia, możliwe było dokładne zlokalizowanie analizowanych loci i przeanalizowanie tych obecnych

na chromosomie 7H, na którym znajduje się gen *nud*, determinujący brak łuski w ziarniakach jęczmienia. Żaden z analizowanych SNP nie był zlokalizowany w bezpośrednim sąsiedztwie genu *nud*. W jego pobliżu znajdowała się jednak grupa 25 SNP, z których większość była unikatowa dla form pozbawionych łuski. Jednocześnie w regionie tym występował bardzo niski odsetek loci heterozygotycznych, co wskazuje na znaczną homogeniczność badanych obiektów w tym rejonie chromosomu 7H. Analiza PCoA wykazała, że zmienność występująca w obrębie chromosomu 7H różnicowała obiekty pod względem typu ziarna (Rys.4). W różnicującym regionie chromosomu 7H Wang i in. (2019) zlokalizowali region hotspot QTL leżący u podstaw cech związanych z wielkością i wagą ziarna. Zidentyfikowane SNP mogą być związane z masą i wielkością ziarna, co może być przydatne w hodowli wysokoplennych odmian jęczmienia o nagim ziarnie.

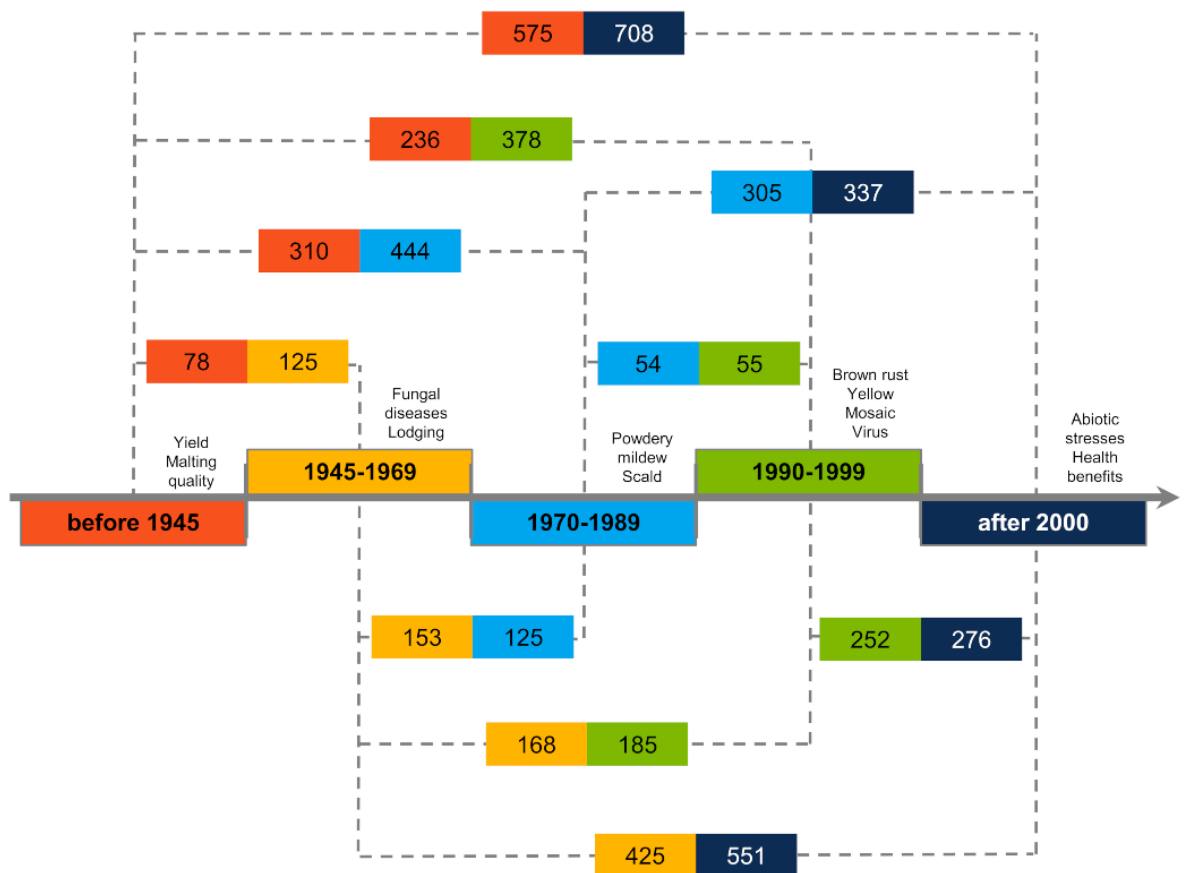


Rys. 4 Zmienność genetyczna na chromosomie 7H dla 116 odmian miejscowych jęczmienia jarego; (a) poziom heterogeniczności i unikatowych SNP ocenianych metodą średniej kroczącej; (b) wyniki analizy głównych współrzędnych (PCoA) z zaznaczeniem typu ziarna.

Trzecia publikacja wchodząca w skład rozprawy doktorskiej zatytułowana „Tracking Changes in the Spring Barley Gene Pool in Poland during 120 Years of Breeding” opisuje zróżnicowanie genetyczne 83 odmian hodowlanych jęczmienia jarego w oparciu o ponad 11,5 tysięcy markerów SNP uzyskanych w wyniku sekwencjonowania metodą DArTseq. Dla badanego materiału obliczono średnie wartości współczynników zróżnicowania, tj. heterozygotyczność obserwowaną ($uHo = 0,058$), heterozygotyczność oczekiwaną ($uHe = 0,197$) i współczynnik wsobności ($F = 0,706$). W grupach odmian wydzielonych na podstawie

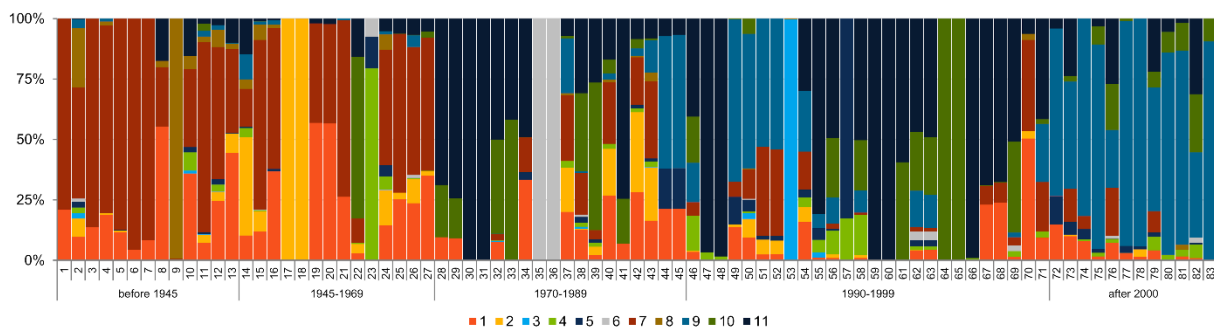
okresu hodowli wykryto występowanie istotnych różnic w wartościach tych parametrów. Poziom heterozygotyczności obserwowanej spadał stopniowo wraz z upływem czasu, natomiast poziom wsobności wzrastał. Ponieważ analizę DArTseq przeprowadzono na próbach zbiorczych, w których każda odmiana była reprezentowana przez osiem siewek, możliwe było oszacowanie poziomu wewnętrznej heterogeniczności badanych odmian. Jęczmień jest gatunkiem samopylnym, dlatego wysoce prawdopodobne jest, że heterozygotyczne loci są wynikiem obecności różnych genotypów w próbce. W obrębie 83 badanych odmian uHo wahało się od 0,011 (Kazimierski) do 0,236 (Cesarski Stieglera).

Obserwacja dynamiki zmian zachodzących w genomie w trakcie 120 lat hodowli była możliwa dzięki ocenie liczby alleli unikatowych, występujących u przynajmniej 25% odmian z danego okresu. Porównanie następujących po sobie okresów hodowli wykazało, że dynamika zmian była różna w różnych momentach dla różnych chromosomów. Wyraźnie wyróżniły się dwa punkty, w których "stara" zmienność została zastąpiona przez "nową", tj. lata 1970-1989 i po 2000 roku (Rys. 5.).



Rys. 5. Podsumowanie zmian liczby unikatowych alleli w ciągu ponad 120 lat hodowli i uprawy jęczmienia jarego w Polsce. Kolory wskazują grupy, a linie przerywane łączą porównywane okresy. Nad osią umieszczono informację o nowych celach hodowlanych.

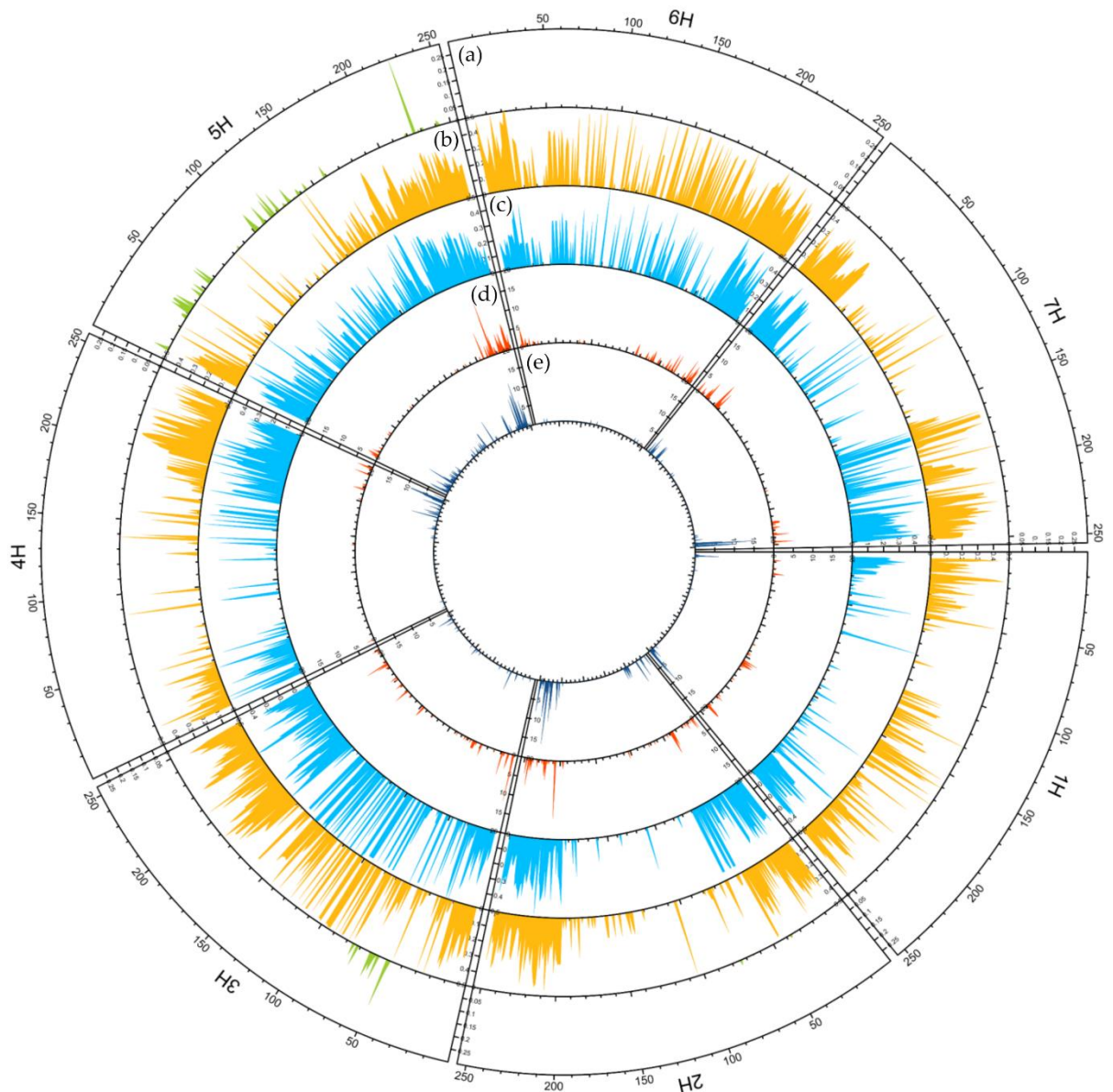
Analiza dystansu genetycznego wykazała, że spośród badanych grup odmian największą pulę genową mają odmiany wyhodowane w ostatnim czasie, natomiast najszerszą pulę genową mają odmiany wyhodowane po II wojnie światowej. Analiza wariacji molekularnej (AMOVA) przeprowadzona dla wszystkich badanych odmian jęczmienia jarego przypisanych do pięciu okresów hodowlanych wykazała, że większość zmienności występowała wewnątrz grup (91%), a tylko 9% stanowiła zmienność międzygrupowa. Wyniki te są zbieżne z analizą struktury genetycznej badanych odmian. Algorytm zaimplementowany w programie STRUCTURE wykazał obecność aż 11 pul genowych, przy czym dwie z nich występowały jedynie w formie domieszki w obiektach będących przedmiotem badań. (Rys. 6). Zarówno PCoA, jak i struktura genetyczna wykazały zachodzenie na siebie następujących po sobie puli genowych. Priorytety hodowli w Polsce są zgodne z tendencjami europejskimi, można więc przypuszczać, że zmiany w strukturze populacji odzwierciedlają ukierunkowanie hodowli na wzrost plonów, a w ostatnich latach także na zwiększenie odporności na patogeny.



Rys. 6. Wynik analizy STRUCTURE dla 83 odmian hodowlanych jęczmienia uzyskanych na podstawie danych DArTseq dla $K=11$, gdzie K jest liczbą utworzonych grup *ad hoc*.

Wykonano również analizę umożliwiającą identyfikację regionów, w których podczas hodowli utrwalone zostały nowe allele nie występujące w odmianach wyhodowanych przed 1945 rokiem. Regiony te występowały głównie na chromosomach 5H oraz 3H. Utrwalenie "nowych" alleli może być związane z programami hodowli odpornościowej (Rys.7).

Przeprowadzono także, weryfikację i identyfikację zduplikowanych obiektów, oraz wyselekcjonowano kolekcję podstawową złożoną z 50 obiektów. Dla 11 odmian zweryfikowano lub zidentyfikowano duplikaty, a w pięciu przypadkach wykazano, że mimo jednakowych danych paszportowych obiekty nie są duplikatami. Zatem, szczegółowo scharakteryzowany genotyp jest konieczny do efektywnej ochrony i wykorzystania zasobów genowych oraz postępu w programach hodowlanych roślin uprawnych.



Rys. 7 Przegląd kołowy siedmiu chromosomów *H. vulgare*. (a) Transformowany FST10 dla odmian wyhodowanych przed 1945 i po 2000 roku; (b) Średnia wartość współczynnika polimorfizmu (PIC) w odmianach wyhodowanych przed 1945 rokiem; (c) Średnia wartość współczynnika polimorfizmu (PIC) w odmianach wyhodowanych po 2000 roku; (d) Liczba unikatowych SNP w odmianach wyhodowanych przed 1945 rokiem; (e) Liczba unikatowych SNP w odmianach wyhodowanych po 2000 roku. Podejście z użyciem średniej kroczącej z interwałem 500 kb i projekcją dla 250 pozycji wzdłuż całej długości chromosomów jęczmienia.

WNIOSKI

1. Poziom zróżnicowania genetycznego kolekcji polskich odmian miejscowych jęczmienia jarego jest porównywalny z tym obserwowanym w innych krajowych kolekcjach odmian miejscowych zbóż.

2. Odmiany lokalne jęczmienia jarego są unikatowym materiałem, który zawiera niewykorzystaną w hodowli pulę genową.
3. Wyniki uzyskane w analizie DArTseq i ISSR są spójne, co świadczy o wysokiej wiarygodności stosowania obu metod do badania zróżnicowania genetycznego zbóż.
4. Odmiany miejscowe o wielorzędowym kłosie nie wykazują odrębności genetycznej od form o kłosie dwurzędowym. Występuje natomiast wyraźna odrębność genetyczna form o ziarnie oplewionym i nieoplewionym.
5. Heterogeniczność wewnątrz obiektów jęczmienia jarego maleje wraz z postępem hodowli.
6. Pula genowa polskich hodowlanych odmian jęczmienia jarego uległa zmianom jakościowym w ciągu 120 lat hodowli.
7. Mimo braku istotnych różnic w poziomie zróżnicowania genetycznego najstarszych i współczesnych odmian jęczmienia jarego, w trakcie 120 lat hodowli doszło do erozji genetycznej natywnej puli genowej.
8. W badanym materiale widoczne są ślady ukierunkowanej selekcji i dotyczą one loci zlokalizowanych na chromosomach 3H i 5H.
9. Aby wykorzystać w hodowli potencjał zasobów genowych jęczmienia jarego zgromadzonych w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych konieczna jest dalsza szczegółowa charakterystyka kolekcji, stworzenie kolekcji bazowej i kolekcji specjalnych zawierających dobrze scharakteryzowane pod względem genotypu i fenotypu linie czyste.

PODSUMOWANIE

Pula genowa polskich, hodowlanych odmian jęczmienia jarego uległa zmianom jakościowym w ciągu 120 lat hodowli. Aby wykorzystać w hodowli potencjał zasobów genowych jęczmienia jarego zgromadzonych w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych konieczna jest dalsza szczegółowa charakterystyka kolekcji, stworzenie kolekcji bazowej i kolekcji specjalnych zawierających dobrze scharakteryzowane pod względem genotypu i fenotypu linie czyste. Kolekcja odmian miejscowych zgromadzona w polskim banku genów wykazuje zarówno zróżnicowanie genetyczne, jak i morfologiczne. Na uwagę zasługuje fakt różnego poziomu zmienności genetycznej w zależności zarówno od chromosomu, jak i kraju pochodzenia akcesji. Wykorzystanie analizy DArTseq przyczyni

się do efektywniejszego zarządzania kolekcją jęczmienia w banku genów. Analiza zmian poziomu różnorodności genetycznej w czasie może nie odzwierciedlać zmian w strukturze genetycznej, dlatego jej wyniki należy traktować z ostrożnością.

SPIS LITERATURY

Arseniuk, E.; Krzymuski, J.; Martyniak, J.; Oleksiak, T. Historia Hodowli i Nasiennictwa na Ziemiach Polskich w XX Wieku. Wydawnictwo Prodruk: Poznań, 2003

FAO. Voluntary Guidelines for the Conservation and Sustainable Use of Farmers' Varieties/Landraces; FAO: Rome, Italy, 2017.

Gepts, P. Plant genetic resources conservation and utilization: The accomplishments and future of a societal insurance policy. *Crop Sci.* 2006, 46, 2278–2292.

Mansfeld, R. Das morphologische System der Saatgerste, *Hordeum vulgare* L. sl. *Der Züchter* 1950, 20, 8–24.

Marone, D.; Russo, M.A.; Mores, A.; Ficco, D.; Laidò, G.; Mastrangelo, A.M.; Borrelli, G.M. Importance of Landraces in Cereal Breeding for Stress Tolerance. *Plants* 2021, 10, 1267.

Plucknett, D.L.; Smith, N.J. *Gene Banks and the World's Food*; Princeton University Press: Princeton, NJ, USA, 2014.

Sempołowski, A. *Hodowla i Uzlachetnianie Roślin Gospodarskich. Skład Główny w Księgarni E. Wende i S-ka*: Warszawa, 1902

Słaboński, A. Stan, metody i perspektywy hodowli jęczmienia jarego i ozimego. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* nr 125, 1972.

Veteläinen, M.; Negri, V.; Maxted, N. *European Landraces: On-Farm Conservation, Management and Use*; Bioversity International: Rome, Italy, 2009; pp. 1–22