

Co chromosomy mówią o ewolucji roślin?

Jolanta MAŁUSZYŃSKA, Agnieszka BRĄSZEWSKA-ZALEWSKA, Marta HOSIAWA-BARAŃSKA

MAŁUSZYŃSKA J., BRĄSZEWSKA-ZALEWSKA A., HOSIAWA-BARAŃSKA M. 2008. **What can we learn about evolution from plant chromosomes?** *Wiadomości Botaniczne* 52(1/2): 29–38.

Plants vary enormously in their genome size, structure, organization and the chromosome number and shape as a consequence of millions years of evolution. Comparative cytogenetic analysis of different karyotypes indicated significant contribution of chromosomal rearrangements to plant evolution. Chromosomal rearrangements such as inversion, translocation and duplication are common. They range from the part of a gene to chromosomal fragment and very often they are difficult for detection with traditional cytogenetic methods. Recent development of molecular cytogenetic techniques opened new possibilities for analysis of chromosome structure. Localization of various DNA sequences, especially repetitive sequences, and recently BAC clones, enabled identification of particular chromosomes or whole genomes in nucleus of many plant species. These investigations have provided new data on chromosomal rearrangements and on great importance of polyploidization and diploidization processes in plant evolution. Molecular and cytological technologies have revealed many novel paleopolyploids, which have been traditionally considered as diploids. The most of angiosperms have experienced polyploidization in their evolutionary history. On the other hand, genetic and epigenetic modifications are leading factors promoting genetic diploidization. Five processes: polyploidization, transposon amplification, chromosome breakage, unequal homologous recombination, and illegitimate recombination are considered as the major mechanisms generating chromosomal variation during evolution.

Polish cytogenetics has significant contribution to plant genome investigation. Karyotyping and genome size analyses have been developed in many laboratories. Chromosome engineering techniques were introduced to basic studies and plant breeding programs. Nowadays the newest techniques of molecular cytogenetics are widely applied to phylogenetic investigations.

KEY WORDS: chromosomes, evolution, FISH genome, molecular cytogenetics, polyploids

Jolanta Małuszyńska, Agnieszka Brąszewska-Zalewska, Marta Hosiawa-Barańska, Katedra Anatomii i Cytologii Roślin, Uniwersytet Śląski, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, e-mail: maluszym@us.edu.pl

WSTĘP

Rośliny różnią się organizacją i strukturą genomów, zawartością jądrowego DNA oraz liczbą i wielkością chromosomów. Różnice te powstały w wyniku przemian zachodzących w genomach przez wiele milionów lat ewolucji, prowadząc do współczesnej bioróżnorodności. Już wczesne

badania cytogenetyczne obejmujące porównawczą analizę kariotypów różnych grup roślin wskazywały na udział przemian chromosomowych w procesie ewolucji. W ostatnich latach dynamiczny rozwój biologii molekularnej pozwolił na poznanie struktury i funkcji genomu, a u niektórych gatunków całkowitej sekwencji DNA. Badania te prowadzone na izolowanym

materiale genetycznym nie dostarczają informacji o jego rozmieszczeniu *in situ* w jądrze komórkowym lub chromosomach. Wprowadzenie technik molekularnych do badań cytogenetycznych zapoczątkowało rozwój cytogenetyki molekularnej, która otworzyła nowe możliwości analizy struktury chromosomów roślinnych. W tym artykule pragniemy zwrócić uwagę na niektóre badania związane z rolą poliploidalności w powstawaniu nowych gatunków roślin oraz przemianach chromosomowych w ich genomach podczas ewolucji.

KRÓTKA HISTORIA BADANIA CHROMOSOMÓW

Chromosomy zostały odkryte w połowie XIX wieku przy okazji poszukiwania mikroorganizmów chorobotwórczych wywołujących liczne epidemie. Termin chromosom został wprowadzony przez Waldeyera (1888), a więc badania chromosomów prowadzone są już od przeszło 120 lat. W badaniach chromosomów, a szczególnie ich zachowania w mitozie, zasłużył się między innymi botanik polskiego pochodzenia, Edward Strasburger (1844–1912). Początkowe badania chromosomów, dotyczyły głównie określania ich liczby, a następnie ich morfologii oraz zachowania w mitozie i mejozie. Tu należy wspomnieć badania prof. Marii Skalińskiej (1890–1977) i jej współpracowników w zakresie kariologii roślin, które są kontynuowane na Uniwersytecie Jagiellońskim (Jankun 1991, Lima-de-Faria 2003).

Cytogenetyka roślin zawsze pozostawała w tyle za badaniami chromosomów zwierzęcych, głównie ze względu na obecność ściany komórkowej, znacznie utrudniającej wykonywanie preparatów chromosomowych. Dlatego istotny postęp w tych badaniach nastąpił po wprowadzeniu metodyki preparatów zgniatanych oraz enzymatycznego trawienia ściany komórkowej. Rozwój genetyki, mikroskopii elektronowej i spektrofotometrii przyspieszyły badania chromosomów i poznanie ich struktury. Wprowadzenie autoradiografii i cytometrycznych pomiarów zawartości jądrowego DNA dało nowe

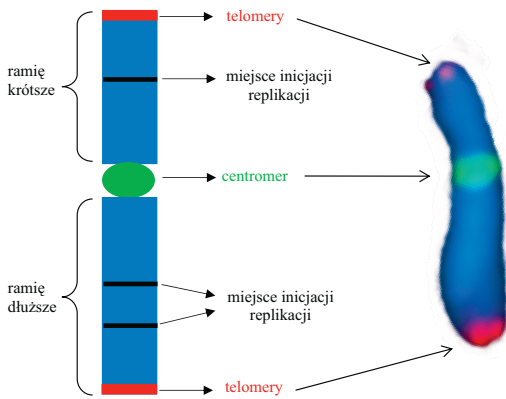
możliwości badania struktury i funkcji genomu jądrowego. W Polsce badania te zostały zainicjowane przez prof. Marię Olszewską i jej współpracowników na Uniwersytecie Łódzkim.

Ważnym przełomem w badaniach cytogenetycznych było wprowadzenie pod koniec lat 60. barwień różnicowych. W Polsce z pewnym opóźnieniem zastosowano te barwienia dla wielu gatunków roślin zarówno w badaniach podstawowych, jak i mających znaczenie praktyczne. Dynamiczny rozwój biologii molekularnej, immunologii i mikroskopii fluorescencyjnej pozwolił na wykorzystanie metod molekularnych do badania chromosomów *in situ*, stwarzając pod koniec lat 80. całkowicie nowe możliwości badania genomów i chromosomów. Natomiast badania porównawcze pozwoliły wykryć przemiany chromosomowe, jakie zaszły w czasie ewolucji gatunków. Rozpoczęła się era cytogenetyki molekularnej.

CHROMOSOM

Chromosom zbudowany jest z liniowej cząsteczki DNA i białek. Ulegając spiralizacji oraz kondensacji, wyodrębnia się z chromatyny jądra komórkowego w czasie podziałów komórkowych i wtedy jest najlepiej widoczny. Mitotyczne chromosomy metafazowe są najczęściej wykorzystywane do badań cytogenetycznych, gdyż wtedy najłatwiej je policzyć, zmierzyć i porównać ich morfologię. DNA chromosomu składa się z sekwencji kodujących – genów oraz dużej liczby sekwencji niekodujących, głównie sekwencji powtarzalnych, obecnych nawet w kilku tysiącach kopii jako sekwencje tandemowe lub rozproszone wzdłuż chromosomów. Można wyróżnić sekwencje mające charakter konserwatywny, które są obecne w chromosomach większości gatunków, oraz sekwencje młodsze ewolucyjnie, które są charakterystyczne dla jednego gatunku lub nawet chromosomu.

Trzy typy niekodujących sekwencji DNA są obecne we wszystkich chromosomach i są niezbędne do pełnienia ich funkcji (Ryc. 1). Są to sekwencje telomerowe, krótkie sekwencje powtórzone na końcach chromosomów, dzięki



Ryc. 1. Schemat i zdjęcie chromosomu metafazowego *Hordeum vulgare* po FISH z sekwencjami telomerową i centromerową.

Fig. 1. The schema and the picture of the *Hordeum vulgare* metaphase chromosome after FISH with telomeric and centromeric sequences.

którym końce chromosomu mogą być replikowane. Drugi typ sekwencji, to sekwencje inicjacji replikacji DNA; w tych miejscach rozpoczyna się podwajanie DNA (replikacja). W chromosomach eukariotycznych występuje wiele miejsc początku replikacji DNA. Trzecim, niezbędnym do funkcjonowania chromosomu odcinkiem jest centromer, do którego przyłączają się białka kinetochoru. Kompleks ten zapewnia prawidłowy rozdział chromosomów do jąder potomnych podczas podziału komórkowego. Między tymi sekwencjami występują geny w pojedynczych lub niewielu kopiach oraz rodziny genów tworzące bloki w jednym locus, jak np. geny rRNA (Alberts et al. 2005, Małuszyńska 2006, Małuszyńska, Szweykowska-Kulińska 2007).

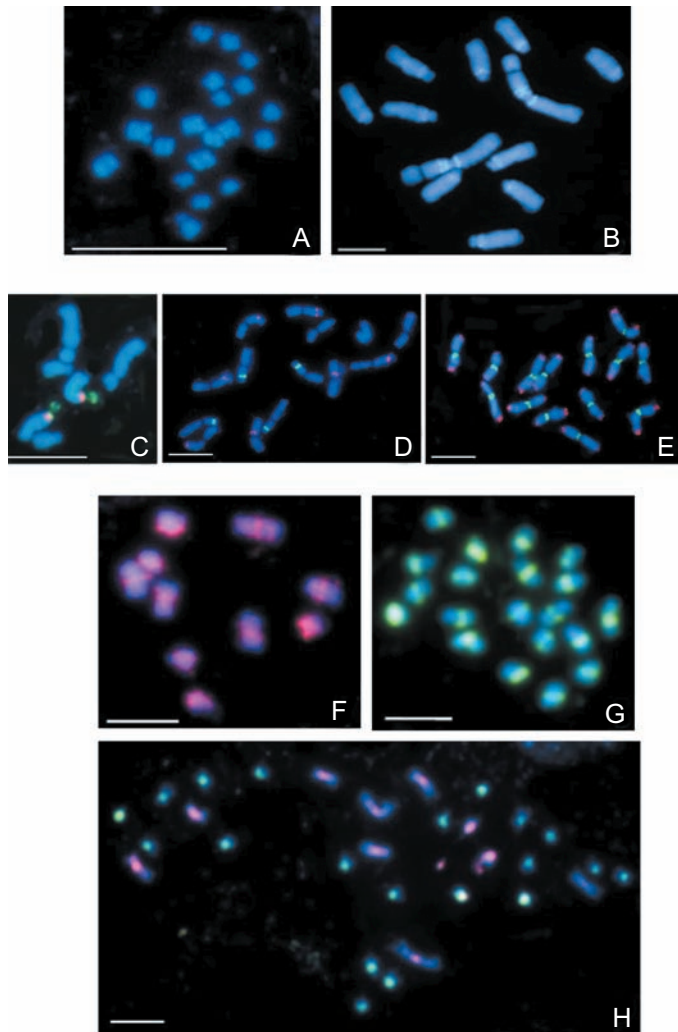
Powszechnie wiadomo, że poszczególne gatunki charakteryzują się określoną wielkością genomu oraz liczbą genomów i chromosomów. U gatunków diploidalnych, w komórkach somatycznych obecne są dwa genomy, u poliploidów odpowiednio więcej. Organizmy eukariotyczne, a szczególnie rośliny, wykazują ogromne zróżnicowanie wielkości genomu, wyrażone zawartością jądrowego DNA w pikogramach lub liczbie par nukleotydów. U roślin okrytonasiennych wielkość genomu opisana jest dla około 1,5% gatunków i wynosi od 0,11 pg u *Fragaria viridis*

do 127 pg u *Fritillaria assyriaca* (Bennett, Leitch 1995), przy czym wielkość ta nie jest uwarunkowana pozycją systematyczną danego gatunku. Nawet blisko spokrewnione gatunki mogą różnić się znacząco rozmiarem genomu, np. w obrębie traw genom żyta (*Secale cereale*; 1CDNA – 9300 Mpz) jest 16 razy większy niż genom ryżu (*Oryza sativa*; 1C DNA – 580 Mpz).

Liczba chromosomów jest również bardzo zróżnicowana, u roślin okrytonasiennych, wynosi w somatycznych komórkach od 4 (np. *Zingiber biebersteiniana* – Poaceae) do około 600 (*Voanioala gerardii* – Palmae) (Bennett 1998). Chromosomy w obrębie genomu różnią się wielkością i morfologią, mogą być liczne, małe, podobne do siebie lub duże i zróżnicowane morfologicznie (Ryc. 2A, B). O morfologii chromosomów decyduje położenie centromeru, który wyznacza długość ramion oraz obecność przewężenia wtórnego z organizatorem jąderka.

Chromosomy mogą podlegać przemianom strukturalnym, polegającym na utracie fragmentu (delecji), powtórzeniu (duplikacji), obróceniu o 180° (inwersji) lub przeniesieniu do innego chromosomu (translokacji). Podstawą powstania aberracji chromosomowych jest pęknięcie podwójnej helisy DNA, a następnie brak jej naprawy lub naprawa nieprawidłowa. Przemiany strukturalne powstałe w wyniku zabiegów hodowlanych czy biotechnologicznych lub wskutek działania czynników środowiskowych mogą istotnie zmienić morfologię chromosomów i kariotyp badanego gatunku.

Istnieją kariotypy, w których chromosomy wyraźnie różnią się wielkością i morfologią. Łatwo jest wtedy zidentyfikować pary chromosomów homologicznych i utworzyć kariotyp (np. *Crepis capillaris*), a następnie, prowadząc porównawcze analizy, śledzić zmiany strukturalne powstałe w czasie ewolucji lub w wyniku działania czynników genotoksycznych (Maluszyńska et al. 2003). Trudniej jest analizować, gdy mamy do czynienia z małymi, słabo zróżnicowanymi i licznymi chromosomami. W takich kariotypach wykrycie i lokalizacja zmian strukturalnych przy stosowaniu zwykłych barwień chromosomów jest bardzo trudne lub niemożliwe.



Ryc. 2. A–B – porównanie wielkości i morfologii chromosomów *Brassica rapa* (A) i *Vicia faba* (B). Chromosomy wybarwione DAPI (niebieska fluorescencja); C–E – lokalizacja sekwencji DNA w chromosomach różnych gatunków roślin: *Crepis capillaris* (C), 5S rDNA (czerwona fluorescencja) i 45S rDNA (zielona fluorescencja), *Hordeum vulgare* (D), 5S rDNA (czerwona fluorescencja) i 45S rDNA (zielona fluorescencja), *Hordeum vulgare* (E), CCS1 (zielona fluorescencja), HT 100.3 (czerwona fluorescencja). Chromosomy wybarwione DAPI (niebieska fluorescencja); F–H – genomowa hybrydyzacja *in situ*: *Brachypodium distachyon* 2n = 10 (F), *Brachypodium* sp. 2n = 20 (G), *Brachypodium* sp. 2n = 30 (H). Czerwona fluorescencja – genomowy DNA *Brachypodium distachyon* 2n = 10, zielona fluorescencja – genomowy DNA *Brachypodium* sp. 2n = 20. Chromosomy wybarwione DAPI (niebieska fluorescencja). Skala = 5 μ m (dzięki uprzejmości dr hab. R. Hasteroka).

Fig. 2. A–B – the comparison of the chromosome size and morphology *Brassica rapa* (A) and *Vicia faba* (B). Chromosomes stained with DAPI (blue fluorescence); C–E – localization of DNA sequences in chromosomes of different species: *Crepis capillaris* (C), 5S rDNA (red fluorescence) and 45S rDNA (green fluorescence), *Hordeum vulgare* (D), 5S rDNA (red fluorescence) and 45S rDNA (green fluorescence), *Hordeum vulgare* (E), CCS1 (green fluorescence), HT 100.3 (red fluorescence). Chromosomes stained with DAPI (blue fluorescence); F–H – genomic *in situ* hybridization: *Brachypodium distachyon* 2n = 10 (F), *Brachypodium* sp. 2n = 20 (G), *Brachypodium* sp. 2n = 30 (H). Red fluorescence – genome DNA of *Brachypodium distachyon* 2n = 10, green fluorescence – genome DNA of *Brachypodium* sp. 2n = 20. Chromosomes stained with DAPI (blue fluorescence). Bar indicates 5 μ m (by courtesy of Dr. R. Hasterok).

FLUORESCENCYJNA HYBRYDYZACJA IN SITU – FISH

Możliwości badania struktury chromosomów zmieniły się wraz z wprowadzeniem metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Metoda ta polega na hybrydyzacji zdenaturowanego DNA (zwanego sondą), znakowanego np. fluorochromem, z komplementarnymi sekwencjami DNA chromosomu na preparacie mikroskopowym. W ten sposób możliwe jest wykrycie i lokalizacja badanej sekwencji DNA w chromosomach lub jądrach interfazowych. Problemem jest jedynie posiadanie specyficznych dla danego gatunku lub chromosomu sond DNA (Maluszynska 2002). Wielką zaletą metody FISH jest możliwość równoczesnego stosowania kilku sond z różnymi barwnikami fluorescencyjnymi (Ryc. 2C–E).

Przykładem wielobarwnej FISH może być zastosowanie dwóch sond, konserwatywnego rDNA i sekwencji satelitarnego DNA do chromosomów allotetraploidnego gatunku *Aegilops ventricosa*, gdzie analiza rozmieszczenia sygnałów hybrydyzacji pozwoliła zidentyfikować chromosomy homologiczne i rozróżnić genomy D i N obecne u tego gatunku, a następnie utworzyć kariogram (Bardsley et al. 1999). Przykładem zastosowania trzech sond w metodzie FISH może być analiza cytogenetyczna genomu *Brassica juncea* ($2n = 2x = 36$; genom AABB), gatunku allotetraploidnego powstałego w wyniku krzyżówki dwóch diploidów *B. nigra* ($2n = 2x = 16$; genom BB) i *B. rapa* ($2n = 2x = 20$; genom AA). Sygnały hybrydyzacji z 5S i 45S rDNA pozwoliły zidentyfikować 20 z 36 chromosomów. Jednoczesne zastosowanie jako trzeciej sondy całkowitego genomowego DNA jednego z gatunków ancestralnych umożliwiło odróżnienie chromosomów genomu AA i BB (Maluszynska, Hasterok 2005).

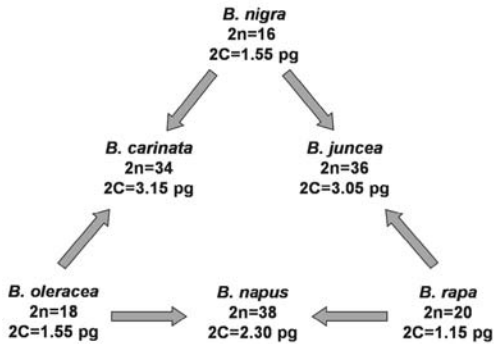
Stosując jako sondę całkowity genomowy DNA, można odróżnić obecne chromosomy w genomie lub chromosomy jednego gatunku w genomie mieszańca. Metoda genomowej hybrydyzacji *in situ* (GISH) służy do identyfikowania gatunków ancestralnych w genomach

poliploidów. Przykładem zastosowania tej metody jest wykorzystanie jako sondy całkowitego genomowego DNA *Brachypodium distachyon* ($2n = 10$) do wyróżnienia chromosomów tego gatunku spośród 30 chromosomów allopoliploida (Ryc. 2F–H) (Hasterok et al. 2004). Określa się to jako pseudomalowanie chromosomów roślinnych, w odróżnieniu od malowania chromosomów człowieka, gdzie wykorzystuje się sondy specyficzne dla poszczególnych chromosomów.

Bardzo obiecujące dla identyfikacji chromosomów roślinnych jest wykorzystanie klonów BAC (sztucznych chromosomów bakteryjnych), które zawierają fragmenty genomowego DNA badanego gatunku. Dysponując biblioteką klonów BAC, można utworzyć zestawy klonów dla poszczególnych chromosomów lub ich fragmentów (kontigi), które po wyznakowaniu fluorescencyjnym mogą być użyte do hybrydyzacji *in situ*, w wyniku której chromosom będzie jednolicie wybarwiony – „pomalowany”. Metoda ta została wykorzystana w badaniach chromosomów *Arabidopsis thaliana*, gatunku modelowego, dla którego istnieją biblioteki BAC, a genom jest całkowicie zsekwencjonowany. Do analizy wybrano jako pierwszy chromosom 4, najmniejszy i posiadający organizator jąderka (NOR). Kontig użyty do FISH zawierał 139 klonów BAC (Lysak et al. 2001). Dalsze badania pozwoliły pomalować wszystkie pięć chromosomów tego gatunku, a dla lepszej rozdzielczości wykorzystano mniej skondensowane chromosomy pachytenowe (Pecinka et al. 2004). Planowane są podobne badania na innych gatunkach roślin (Jenkins, Hasterok 2007).

PRZEMIANY CHROMOSOMOWE W EWOLUCJI ROŚLIN

Dysponując nowymi technikami cytogenetyki molekularnej, możemy próbować odpowiedzieć na pytanie, jakim przemianom podlegają chromosomy w czasie ewolucji? Na ten temat ukazuje się w literaturze naukowej coraz więcej prac oryginalnych oraz różnych publikacji przeglądowych i opracowań książkowych (Olszewska, Małuszyńska 2001, Leitch et al. 2004).



Ryc. 3. Zależności między diploidalnymi i poliploidalnymi gatunkami *Brassica* (trójkąt U). Wielkość genomu wg Bennett, Leitch 2005.

Fig. 3. Relationships between diploid and polyploid *Brassica* species (U triangle). Genomes size according to Bennett, Leitch 2005.

Konwencjonalne metody cytogenetyczne już od dawna były wykorzystywane w analizie pokrewieństwa między gatunkami. Dobrym przykładem takich badań może być tzw. trójkąt U zaproponowany przez japońskiego badacza U (1935). Na podstawie analizy mejozy i koniugacji chromosomów przedstawił on korelacje między 6 gatunkami *Brassica*. Trzy gatunki diploidalne *B. nigra*, *B. rapa* i *B. oleracea*, umieszczone na rogach trójkąta, są gatunkami ancestralnymi allotetraploidów *B. napus*, *B. juncea* i *B. carinata* (Ryc. 3). Trochę później Röbbelen (1960), stosując tradycyjne metody analiz cytogenetycznych, zasugerował paleopoliploidalny charakter diploidalnych gatunków *Brassica*. Badania te zostały w pełni potwierdzone badaniami molekularnymi (Quiros, Hu 1995).

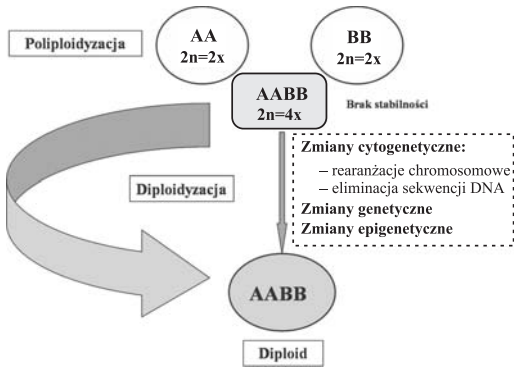
Po zsekwencjonowaniu genomu *Arabidopsis*, ku dużemu zaskoczeniu badaczy stwierdzono, że *Arabidopsis thaliana*, uznawany za typowy gatunek diploidalny, przeszedł również w swojej historii poliploidyzację, o czym świadczą liczne powtórzenia w genomie. Analiza sekwencji wykazała także liczne rearanżacje, które wystąpiły po wcześniejszym procesie poliploidyzacji, takie jak inwersje i translokacje (Arabidopsis Genome Initiative 2000).

Powstaje pytanie, jakie mechanizmy przemian chromosomowych w czasie ewolucji

prowadzą do powstawania nowych gatunków? Nie wszystkie procesy są wyjaśnione, ale do ważniejszych można zaliczyć przede wszystkim poliploidyzację, pęknięcia chromosomów, aktywację elementów ruchomych, niesymetryczną rekombinację homologiczną i rekombinację nieuprawnioną (Ma, Gustafson 2005).

Szacuje się, że około 70% roślin okrytonasiennych jest poliploidami, a większość ważnych roślin uprawnych to allo- (pszenica, rzepak, owies, banan, tytoń) lub autopoliploidy (ziemniaki). Te, które uznawano za diploidy, okazały się paleopoliploidami (kukurydza, bawełna, soja). W ewolucji szczególną rolę odgrywają alloploidy, tzn. rośliny, które pochodzą z krzyżowania różnych gatunków, często spokrewnionych. Rośliny takie muszą mieć co najmniej dwa genomy każdego typu, aby mogła zachodzić prawidłowo mejoza, ale ze względu na pokrewieństwa może zachodzić koniugacja chromosomów homeologicznych, powodując zaburzenia w mejozie, a w konsekwencji obniżenie płodności. Poliploidy wraz ze zwielokrotnieniem liczby chromosomów mają zwielokrotnioną liczbę kopii poszczególnych genów. To wszystko powoduje, że poliploidy są bardzo niestabilne genetycznie i cytologicznie, co prowadzi do powstania genetycznych i epigenetycznych przemian. Dlatego też genom poliploida nie jest sumą genomów diploidalnych. W procesie poliploidyzacji powstaje nowy genom, będący wynikiem interakcji między genomami ancestralnymi (Ryc. 4).

Alloploidy nowo resyntetyzowane na drodze krzyżowania znanych gatunków ancestralnych są dobrym sprawdzianem, czy wytypowane gatunki są rzeczywiście rodzicami badanego alloploida, a jednocześnie dają możliwość śledzenia zmian, jakie zachodzą w kolejnych pokoleniach mieszańca. Przeprowadzone badania na kilku resyntetyzowanych gatunkach, takich jak *Arabidopsis suecica*, pszenica, pszenżyto i *Brassica*, wykazały szybkie zmiany genetyczne i cytogenetyczne, prowadzące do stabilizacji mieszańców i w efekcie zachowania się chromosomów jak u diploida. Proces ten został nazwany diploidyzacją alloploidów (Ma, Gustafson 2005).



Ryc. 4. Schemat procesów poliploidyacji i diploidyacji w ewolucji roślin.

Fig. 4. The schema of poliploidization and diploidization processes in plant evolution.

Diploidyacja genetyczna obejmuje zmiany genetyczne, takie jak wyciszenie jednej kopii genów lub zmianę jego funkcji na drodze mutacji. Ostatnio, coraz większą rolę przypisuje się modyfikacjom epigenetycznym. Natomiast diploidyacja cytologiczna obejmuje opisywaną u wielu gatunków eliminację sekwencji DNA, oraz przemiany chromosomowe. Porównanie średnich zawartości jądrowego DNA gatunków diploidalnych z poliploidami pokazuje znaczne obniżenie wielkości genomu poliploidów w stosunku do wielkości spodziewanej, tzn. będącej wielokrotnością diploida (Leitch, Bennett 2004).

Jaki jest mechanizm zmniejszania genomu? Stwierdzono, wykorzystując resyntetyzowane allopoliploidy, że zmniejszenie wielkości genomu następuje już w pierwszych pokoleniach mieszańców poprzez eliminację określonych sekwencji DNA. Eliminację sekwencji DNA opisano u pszenicy (Ozkan et al. 2003) i *Brassica* (Song et al. 1995). Analiza pszenżyta wykazała, że genom pszenicy był stosunkowo stabilny, podczas gdy żyta ulegał przemianom i eliminacji sekwencji. Wiąże się to z mniejszym pokrewieństwem między żytem i pszenicą niż np. między gatunkami ancestralnymi pszenicy (Ma et al. 2002). Eliminacja sekwencji DNA obejmuje zarówno sekwencje występujące w małej liczbie kopii, jak i sekwencje wysoko powtarzalne i nie

jest losowa. Interesujące, że pewne sekwencje są eliminowane częściej niż inne. Proces eliminacji jest szybki i dotyczy tych samych sekwencji w kolejnych pokoleniach mieszańców lub różnych osobników w tej samej krzyżówce, czy nawet u różnych allopoliploidów otrzymanych z krzyżowania innych form rodzicielskich (Liu et al. 1998, Kashkush et al. 2002, Ma et al. 2002).

Lokalizacja na drodze FISH genów rybosomalnego RNA jest dobrym markerem chromosomów i jest często wykorzystywana przez cytogenetyków do porównawczych analiz chromosomów. I tak u gatunków z rodzaju *Brassica* wyróżniono osiem typów chromosomów niosących geny 45S lub 5S rRNA, charakterystycznych dla poszczególnych genomów (Hasterok et al. 2001). Okazało się, że poliploidy nie zawsze mają wielokrotność loci gatunków diploidalnych, a nowe typy lokalizacji badanej sekwencji pokazują, jakie przemiany nastąpiły w czasie specjacji (Hasterok et al. 2006). Innym przykładem wykorzystania chromosomów niosących rDNA do analiz filogenetycznych mogą być ostatnio prowadzone badania na *Brachypodium distachyon* (trawie mającej szansę stać się rośliną modelową w biologii molekularnej obok *Arabidopsis* i ryżu). Analizowano kolekcję przeszło 50 ekotypów *B. distachyon* z liczbą chromosomów od 10 do 30. Początkowo uważano, że jest to seria autopoliploidów, ale porównanie morfologii chromosomów i lokalizacji genów rRNA wykazało, że niektóre poliploidy nie są wynikiem podwojenia chromosomów *B. distachyon*. Gatunek ten zawiera parę chromosomów z 5S rDNA i parę z 45S rDNA, a badane linie heksaploidalne nie mają trzech par takich chromosomów, poza tym lokalizacja genów rRNA jest inna. Wskazuje to, że ekotyp z 30 chromosomami jest raczej allopoliploidem zawierającym jeden genom pochodzący od *B. distachyon*, a drugi podobny do *B. sylvaticum* (2n=20) (Hasterok et al. 2004).

Porównawcza analiza lokalizacji genów rRNA w poliploidalnych genomach *Chenopodium album* dostarczyła również danych wskazujących na eliminację sekwencji rDNA. Genotypy tetraploidalne i heksaploidalne mają

mniejszą liczbę loci genów rRNA niż wynikałoby to z liczby u diploida, co wskazuje na utratę loci rDNA w genomach poliploidalnych przy zachowanej prawidłowej liczbie chromosomów (Kolano et al. 2005).

Diploidyżacja na drodze chromosomowych rearanzacji obejmuje nie tylko utratę sekwencji DNA, jak np. wspomniana utrata genów rRNA, ale również innego typu przemiany (Volkov et al. 1999). Istotne znaczenie w procesie diploidyżacji chromosomowej mają opisywane u wielu allopoliploidów translokacje międzygenomowe pomiędzy chromosomami homeologicznymi (Kenton et al. 1993, Jellen et al. 1994, Pasakinskiene, Jones 2005).

Przeciwieństwem do wyżej wspomnianych są gatunki allopoliploidalne, których diploidalne genomy ancestralne zachowały się bez większych zmian w genomie allopoliploidalnym. Przykładem może być stosunkowo młody, allopoliploidalny gatunek *Spartina anglica* ($2n = 122$), który powstał ze skrzyżowania *S. maritima* ($2n = 60$) i *S. alterniflora* ($2n = 62$) w końcu XIX wieku. Molekularne analizy porównawcze wykazały, że w genomie *Spartina anglica* nie zaszły istotne zmiany od czasu powstania tego gatunku (Baumel et al. 2001, Ainouche et al. 2004). Wskazuje to, że różne gatunki mają inną reakcję na allopoliploidyżację, a czas i poziom procesów prowadzących do diploidyżacji zależy od gatunków.

Procesy poliploidyżacji i diploidyżacji są obserwowane nie tylko u roślin okrytonasiennych. Poliploidy występują wśród mszaków, w tym u wątrobowców. Jeden z gatunków wątrobowców *Pellia borealis* jest allopoliploidem, powstałym z krzyżowania dwóch gatunków kryptycznych *Pellia epiphylla* S i N. Porównawcza analiza cytogenetyczna tych trzech kariotypów potwierdziła allopoliploidalne pochodzenie *P. borealis*, utratę loci rDNA i nowe typy chromosomów, które wskazują na przemiany chromosomowe, które zaszły po powstaniu allotetraploida (Orzechowska et al. 2005).

Naczelnym celem w badaniach ewolucji gatunków jest określenie kariotypu ancestralnego i rekonstrukcja zdarzeń prowadzących do

współczesnego kariotypu. Można to osiągnąć, wykorzystując kolinearność między gatunkami. Jedna droga opiera się na mapowaniu genetycznym, jak to przedstawiono dla roślin zbożowych (Moore et al. 1995), a druga, wykorzystująca porównawcze malowanie chromosomów, jest z powodzeniem stosowana w analizie genomu człowieka i innych kręgowców (Scherthan et al. 1994).

Wykorzystując klony BAC *Arabidopsis thaliana* i opracowaną dla tego gatunku metodę malowania chromosomów, przedstawiono bardzo interesujące badania kolinearności między *A. thaliana* i innymi gatunkami z rodziny *Brassicaceae*. Celem tej pracy było sprawdzenie hipotezy, że kariotyp *A. thaliana* powstał z ancestralnego kariotypu z ośmioma chromosomami. Na podstawie przeprowadzonej analizy zaproponowano schemat przemian chromosomowych prowadzących do redukcji liczby chromosomów z 8 u *A. lyrata* do 5 u *A. thaliana*. W tym celu kontigi klonów BAC *A. thaliana* tak dobrano, aby na drodze hybrydyzacji *in situ* pomalować chromosomy *A. lyrata* na różne kolory, a następnie użyto tych zestawów do malowania chromosomów *A. thaliana*. I tak sonda, malująca dystalną część chromosomu 1 *A. thaliana*, maluje cały chromosom 2 *A. lyrata*. Analizując szczegółowo rozkład sond, można było określić miejsca fuzji chromosomów, oraz wykryć inwersje, wzajemne translokacje, jak też eliminacje małych odcinków chromosomów. Zastosowanie tych sond do malowania chromosomów innych spokrewnionych gatunków pozwoliło zrekonstruować ewolucję kariotypów tych gatunków (Lysak et al. 2006).

Ostatnio, bardzo interesujące badania nad kolinearnością genomów *Arabidopsis* i *Brassica* przedstawił zespół polskich badaczy (Ziolkowski et al. 2006). Wykorzystali oni również klony BAC *Arabidopsis* zawierające określone fragmenty chromosomu 2 i 3 *A. thaliana* do FISH z chromosomami *Brassica oleracea*. Potwierdzili, że badane regiony chromosomów *Arabidopsis* występują trzykrotnie w genomie *Brassica*, ale tylko jeden blok jest niezmienny. Inne uległy rearanzacjom strukturalnym,

prowadząc do diploidyzacji genomu *Brassica*. Analizując miejsca pęknięcia chromosomu, wykazali, że heksaploidalny przodek *Brassica* powstał w wyniku wielu zdarzeń rozciągniętych w czasie, a ostatnim zdarzeniem była allopoliploidyzacja. Zaproponowano model ewolucji tych gatunków wykazując, że tetraploidyzacja przodka wydarzyła się 30–35 milionów lat temu, a rozejście się dróg ewolucji *Arabidopsis* i *Brassica* nastąpiło około 20–24 milionów lat temu.

Cytogenetyczna analiza chromosomów w połączeniu z badaniami genetyki molekularnej dostarczyła informacji o niektórych procesach zachodzących w ewolucji, ale wiele pozostało jeszcze niewyjaśnionych. Dotychczasowe badania wykazały kluczową rolę w ewolucji roślin procesów poliploidyzacji i następującej po niej diploidyzacji, będącymi jednym ze źródeł zmienności.

LITERATURA

- AINOUCHE M. L., BAUMEL A., SALMON A. 2004. *Spartina anglica* C. E. Hubbard: a natural model system for analyzing early evolutionary changes that affect allopolyploid genomes. *Biol. J. Linn. Soc.* **82**: 475–484.
- ALBERTS B., BRAY D., HOPKIN K., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P. 2005. Podstawy biologii komórki. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796–815.
- BARDSLEY D., CUADRADO A., JACK P., HARRISON G., CASTILHO A., HESLOP-HARRISON J. S. 1999. Chromosome markers in the tetraploid wheat *Aegilops ventricosa* analysed by *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.* **99**: 300–304.
- BAUMEL A., AINOUCHE M. L., LEVASSEUR J. E. 2001. Molecular investigations in populations of *Spartina anglica* C. E. Hubbard (Poaceae) invading coastal Brittany (France). *Mol. Ecol.* **10**(7): 1689–1701.
- BENNETT M. D. 1998. Plant genome values: How much do we know? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2011–2016.
- BENNETT M. D., LEITCH I. J. 1995. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany* **76**: 113–176.
- BENNETT M. D., LEITCH I. J. 2005. Nuclear DNA amounts in Angiosperms: progress, problems and prospects. *Annals of Botany* **95**: 45–90.
- HASTEROK R., JENKINS G., LANGDON T., JONES R. N., MALUSZYNSKA J. 2001. Ribosomal DNA is an effective marker of *Brassica* chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* **103**: 486–490.
- HASTEROK R., TRAPER J., JENKINS G. 2004. Laying the cytotoxic foundations of a new model grass, *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv. *Chromosome Res.* **12**: 1–7.
- HASTEROK R., WOLNY E., HOSIAWA M., KOWALCZYK M., KULAK-KSIAZCZYK S., KSIAZCZYK T., HENEEN W. K., MALUSZYNSKA J. 2006. Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of *Brassicaceae*. *Annals of Botany* **97**: 205–216.
- JANKUN A. 1991. Maria Magdalena Skalińska (1890–1977) – The 100th anniversary of her birth. *Polish Bot. Stud.* **2**: 3–16.
- JELLEN E. N., GILL B. S., COX T. S. 1994. Genome *in situ* hybridization differentiates between A/D and C genome chromatin and detects intergenomic translocations in polyploid oat species (genus *Avena*). *Genome* **37**: 613–618.
- JENKINS G., HASTEROK R. 2007. BAC ‘landing’ on chromosomes of *Brachypodium distachyon* for comparative genome alignment. *Nature Protocols* **2**(1): 88–98.
- KASHKUSH K., FELDMAN M., LEVY A. A. 2002. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics* **160**: 1651–1659.
- KENTON A., PAROKONNY A. S., GLEBA Y. Y., BENNETT M. D. 1993. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *Mol. Gen. Genet.* **240**(2): 159–169.
- KOLANO B., SIWIŃSKA D., MALUSZYNSKA J. 2005. Molecular cytogenetic analysis of genome structure in *Chenopodium album* complex. Wydawnictwo Naukowe UAM, s. 507–517.
- LEITCH A. R., SOLTIS D. E., SOLTIS P. S., LEITCH I. J., PIRES J. C. 2004. Biological relevance of polyploidy: ecology to genomics. *Biol. J. Linn. Soc.* **82**.
- LEITCH I. J., BENETT M. D. 2004. Genome downsizing in polyploid plants. *Biol. J. Linn. Soc.* **82**: 651–663.
- LIMA-DE-FARIA A. 2003. One hundred years of chromosome research and what remains to be learned. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- LIU B., VEGA J. M., SEGAL G., ABBO S., RODOVA M., FELDMAN M. 1998. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. I. Changes in low-copy non-coding DNA sequences. *Genome* **41**: 272–277.
- LYSAK M. A., BERR A., PECINKA A., SCHMIDT R., MCBREEN K., SCHUBERT I. 2006. Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related *Brassicaceae* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 5224–5229.

- LYSAK M. A., FRANSZ P. F., ALI B. M., SCHUBERT I. 2001. Chromosome painting in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **28**(6): 689–697.
- MA X. F., GUSTAFSON J. P. 2005. Genome evolution of allopolyploids: a process of cytological and genetic diploidization. *Cytogenet. Genome Res.* **109**: 236–249.
- MA X. F., RODRIGUEZ MILLA M. A., GUSTAFSON J. P. 2002. AFLP-based genome studies of triticales following polyploidization. W: A. ANIOL, E. ARSENIUK, K. COOPER, N. DARVEY, P. GUSTAFSON, R. JESSOP, A. LUKASZEWSKI, B. MYER, M. MERGOUM, G. OETTLER, D. SALMON (eds), Proceedings 5th International Triticale Symposium. Plant Breeding and Acclimatization Institute, Radzikow, Poland, Vol I, s. 89–94.
- MALUSZYNSKA J. 2002. *In situ* hybridization in plants – methods and application. W: M. S. JAIN, D. S. BRAR, B. S. AHLUWALIA (eds), Molecular techniques in crop improvement. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, s. 299–326.
- MALUSZYNSKA J., HASTEROK R. 2005. Identification of individual chromosomes and parental genomes in *Brassica juncea* using GISH and FISH. *Cytogenet. Genome Res.* **109**: 310–314.
- MALUSZYNSKA J., JUCHIMIUK J., WOLNY E. 2003. Chromosomal aberrations in *Crepis capillaris* cells detected by FISH. *Folia Histochem. Cytobiol.* **41**: 101–104.
- MALUSZYNSKA J. 2006. Jądro komórkowe. W: P. WOJTASZEK, A. WOŹNY, L. RATAJCZAK (red.), Biologia komórki roślinnej. T. 1. Struktura. PWN, Warszawa, s. 38–64.
- MALUSZYNSKA J., SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA Z. 2007. Budowa genomu komórki. W: P. WOJTASZEK, A. WOŹNY, L. RATAJCZAK (red.), Biologia komórki roślinnej. T. 2. Funkcja. PWN, Warszawa, s. 7–35.
- MOORE G., DEVOS K. M., WANG Z., GALE M. D. 1995. Grasses, line up and form a circle. *Current Biology* **5**: 737–739.
- OLSZEWSKA M. J., MALUSZYNSKA J. 2001. Cytogenetyka molekularna w ustalaniu cech gatunkowych oraz ich zmienności w analizie pokrewieństwa roślin okrytozalążkowych. *Postępy Biologii Komórki* **28**(2): 197–218.
- ORZECZOWSKA M., MALUSZYNSKA J., SIWIŃSKA D. 2005. Molecular cytological comparative analysis of *Pellia* species (Hepaticae). W: Abstracts, XVII International Botanical Congress, Vienna, Austria, s. 450.
- OZKAN H., TUNA M., ARUMUGANATHAN K. 2003. Nonadditive changes in genome size during allopolyploidization in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *J. Heredity* **94**: 260–264.
- PASAKINSKIENE I., JONES N. 2005. A decade of ‘chromosome painting’ in *Lolium* and *Festuca*. *Cytogenet. Genome Res.* **109**: 393–399.
- PECINKA A., SCHUBERT V., MEISTER A., KRETH G., KLATTE M., LYSAK M. A., FUCHS J., SCHUBERT I. 2004. Chromosome territory arrangement and homologous pairing in nuclei of *Arabidopsis thaliana* are predominantly random except for NOR-bearing chromosomes. *Chromosoma* **113**: 258–269.
- RÖBBELEN G. 1960. Beiträge zur Analyse des Brassica-Genoms. *Chromosoma* **11**: 205–228.
- QUIROS C. F., HU J. 1995. DNA-based chromosome markers: *Brassica* crops as case study. W: M. TERZI, R. CELLA, A. FALAVIGNA (eds), Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, s. 333–339.
- SCHERTHAN H., CRAMER T., ARNASON U., WEIER U., LIMADE-FARIA A., FRONICKE I. 1994. Comparative chromosome painting discloses homologous segments in distantly related mammals. *Nature Genet.* **6**: 342–347.
- SONG K., LU P., TANG K., OSBORN T. C. 1995. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploidy evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7719–7723.
- U N. 1935. Genome-analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese J. Bot.* **7**: 389–452.
- VOLKOV R. A., BORISJUK N. V., PANCHUK I. I., SCHWEIZER D., HAMLEBEN V. 1999. Elimination and rearrangement of parental rDNA in the allotetraploid *Nicotiana tabacum*. *Mol. Biol. Evol.* **16**(3): 311–320.
- WALDEYER W. 1888. Über Karyokinese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen. *Arch. Mikr. Anat.* **32**: 1–222.
- ZIOLKOWSKI P. A., KACZMAREK M., BABULA D., SADOWSKI J. 2006. Genome evolution in *Arabidopsis/Brassica*: conservation and divergence of ancient rearranged segments and their breakpoints. *Plants J.* **47**: 63–74.
- Bennett M. D., Leitch I. J. 2005. Plant DNA C-values Database (release 4.0, October 2005). <http://data.k.ew.org/Cvalues/homepage.html>