

Stefan Malepszy

Katedra Genetyki i Hodowli
Roślin Ogrodniczych SGGW-AR
Warszawa

**Pomidor –
„użyteczna *Drosophila*”
nowoczesnej biologii**

1. Wprowadzenie

Truizmem jest stwierdzenie, że zmierzając do wyjaśnienia przebiegu danego procesu badacz wybiera określony gatunek (model). Wybór danego gatunku jest podyktowany wieloma czynnikami związanymi przede wszystkim z właściwościami biologicznymi, przy czym dobrze jest, aby model był rośliną użytkową. W ostatnich latach takim roślinnym gatunkiem modelowym do badań z zakresu współczesnej biologii i biotechnologii, stał się pomidor.

2. Ogólna charakterystyka

Lycopersicon esculentum, Solanaceae

Istnieje wiele powodów, które sprawiają, że pomidor (*Lycopersicon esculentum*, Solanaceae) jest faworyzowanym modelem w badaniach biologicznych, a szczególnie w pracach z zakresu genetyki, zarówno klasycznej jak i molekularnej. Do nich należą przede wszystkim: 1) budowa rośliny (bogata architektonicznie) umożliwiająca wykrycie olbrzymiej liczby zmian zarówno epigenetycznych jak i genetycznych, co przy dużej reaktywności na działanie czynników środowiskowych jest bardzo dobrym indykatorem zachodzących zmian; 2) łatwość uprawy zarówno w warunkach szklarniowych jak i polowych oraz łatwość rozmnażania przez nasiona jak i poprzez ukorzone sadzonki; 3) naturalna samopylność ułatwiająca prowadzenie linii czystych genetycznie, a obfitość oraz trwałe i obojętne na długość dnia kwitnienie umożliwiają dysponowanie gametami pojedynczej rośliny przez długi okres; 4) istnienie bogatych kolekcji zmienności genetycznej. Tu wymienić należy przede wszystkim: Tomato Genetics Stock Center at the University of California – Davies, National Plant Germplasm System USDA oraz Wszelkiewski Instytut Roślin (WIR) w Leningradzie. Kolekcje te obejmują mutanty monogeniczne wszelkiego typu, mutanty o zmienionej liczbie chromosomów, linie z genami markerowymi oraz znane formy dzikie. Ponadto istnieje bardzo bogata kolekcja mutantów sztucznych, indukowanych promieniami X licząca przeszło 300 form u *L. esculentum* i przeszło 200 u blisko spokrewnionego *L. pimpinellifolium* oraz nie mniejsza grupa mutantów uzyskanych po działaniu mutagenami chemicznymi; 5) prosty diploidalny genom zawierający 12 chromosomów bardzo dobrze zmapowanych zarówno metodami klasycznej genetyki jak i molekularnej (rys. 1 i 2). Chromosomy są dobrze widoczne w pachytenie o dobrze rozróżnialnych stosunkach ramion oraz dobrym rozłożeniu i morfologii heterochromatyny; 6) łatwość w kulturze i regeneracji roślin technikami *in vitro* oraz istnienie skutecznych metod wprowadzania obcych genów za pomocą transformacji; 7) bardzo dobre opracowanie od strony molekularno-genetycznej; 8) duże znaczenie ekonomiczne oznaczające stałe zainteresowanie rolnictwa nowymi, lepszymi i łatwiejszymi w uprawie odmianami.

3. Genom

Pomidor należy do stosunkowo niedużego rodzaju *Lycopersicon* w dużej rodzinie *Solanaceae*. Wyróżnia się spośród ważnych roślin uprawnych tym, że ma stosunkowo mały genom ($c=7,14 \times 10^5$ Kz) o masie 0,74 pg, ma haploidalne jądro oraz dobrze rozwiniętą mapę liczącą ok. 350 markerów RFLP (91). Stwarza to dobre podstawy do rozwijania i testowania metod klonowania genów za pomocą „odwrotnej genetyki” (20,91). Metoda ta wymaga, aby pozycja mapowa genu odpowiedzialnego za dany fenotyp znajdowała się w obszarze wysyconym sprzężeniami dla RFLP. Można wtedy, rozpoczynając od flankujących markerów DNA, przesuwając się po chromosomie (*chromosome walk*) do interesującego genu, szczególnie u organizmów o bardzo małym genomie. Klasycznym przykładem jest tutaj *D. melanogaster*, gdzie tą metodą sklonowano liczne geny (5). W genomie występuje bardzo niewiele wewnętrznych duplikacji (15,78), co daje m.in. jednoznaczność segregacji cech morfologicznych, uwarunkowanych monogenicznie. Wspólną cechą mitotycznych i mejozycznych chromosomów jest stałe występowanie obszarów heterochromatycznych w proksymalnej pozycji centromeru. Wyjątkiem jest tylko krótkie ramię chromosomu 2, które jest całe heterochromatynowe i zawiera obszar NOR. Pomidor jest nietolerancyjny na brak równowagi chromosomowej (43) i nie wykazuje cytologicznie wykrywalnych euchromatynowych deficytów zarówno w komórkach żeńskich jak i w męskich. Chromosomy *Lycopersicon* i *Solanum* różnią się morfologicznie bardzo słabo i jest to utrudnieniem w analizie cytologicznej mieszańców oddalonych w tej rodzinie. Genomy pozajądrowe są stosunkowo dobrze zbadane, a wykrycie pewnych różnic pomiędzy genomami mitochondrialnymi gatunków z rodzajów *Lycopersicon* i *Solanum* posłużyło do zmiany w klasyfikacji jednego z gatunków, a mianowicie *L. peruvianum* – wcześniej należącego do *Solanum* (55,72).

Genom mitochondrialny ma wielkość około 270 Kz (34) i wewnątrz rodzaju występują w nim znacznie większe różnice w sekwencjach aniżeli w genomie chloroplastowym (55). Mt DNA izolowano z liści, zawiesziny komórkowej i owoców (33,34,55). Genom chloroplastowy ma wielkość 155–160 Kz (72) i istnieje dość dokładna jego mapa fizyczna (72,74) oraz genetyczna (77). Analiza ct DNA gatunków z rodzaju *Lycopersicon* i trzech spokrewnionych z rodzaju *Solanum* pozwoliła na zweryfikowanie poglądów na pochodzenie niektórych z nich (72).

U pomidora znane są linie o różnej liczbie genomów – haploidalne, triploidalne i tetraploidalne powstające spontanicznie, a te ostatnie również pod wpływem kolchicyny i kultury protoplastów. Tetraploidy wykorzystano do uzyskania mieszańców generatywnych *L. esculentum* x *L. lycopersicoïdes* i kolejnych pokoleń krzyżowania wypierającego (81). Ciekawych informacji może dostarczyć porównanie tych mieszańców z otrzymanymi już mieszańcami somatycznymi (31).

4. Sprzężenia

Pomidor jest jedną z kilku roślin uprawnych najlepiej opracowanych pod względem genetycznym. Znana jest olbrzymia liczba cech uwarunkowanych monogenicznie, szacowana przez Stevens'a i Rick'a (1986) na 1200 monogenicznych mutantów. Wiele z nich zostało zmapowanych i mapa genetyczna tych loci jest dobrze uzupełniona mapą molekularną RFLP, chociaż z nią jeszcze nie jest zintegrowana. Stwarza to, jak już wspomniano, szczególnie korzystne warunki do izolacji i klonowania genów. Istnieje również mapa sprzężeń izoenzymatycznych obejmująca 41 genów odpowiedzialnych za 15 podstawowych reakcji, przy czym 36 z nich ma dokładnie ustalone miejsca na chromosomach.

W wyniku badań genetycznych nad pomidorem powstała koncepcja graficznego genotypu (99), możliwa do zrealizowania dzięki stworzeniu przez Tanksley'a (4,91,35) mapy 300 markerów RFLP rozłożonych na wszystkich dwunastu chromosomach. Koncepcja ta została z powodzeniem wykorzystana do analizy stopnia mieszańcowości dużej grupy mieszańców międzygatunkowych (99). Główne cechy cytogenetyczne mapy pomidora przedstawił Gill (1983) wska-

zując m.in. na nielosowe rozłożenie markerów pomiędzy chromosomami, ramionami chromosomów i wewnątrz ramion. Całkowicie heterochromatynowe, krótkie ramię chromosomu 2 nie ma markerów, ale jest bogate w cistrony rybosomalne. W stosunku do ogólnej zawartości euchromatyny chromosom 11 ma więcej loci niż należałoby oczekiwać, a chromosom 5 ma nieproporcjonalnie mało loci. Obszary pericentryczne chromosomów są nadmiernie zagęszczone, a w wielu obszarach dystalnych są dwa obszary „puste”. Zlokalizowano również miejsca 10 loci o sekwencji zbliżonej do genów odpowiedzialnych za tworzenie aktywności (4) używając sklonowanego genu aktywności z soi i analizy typu Southern'a. Pojedyncze loci stwierdzono na chromosomach 1, 3 i 10, dwa na chromosomie 4, pozostałe mapowały się niezależnie od siebie i zastosowanych markerów molekularnych.

5. Gatunki dzikie

Rodzaj *Lycopersicon* nie jest liczny, ale występuje w nim znaczna zmienność genetyczna, o której wykorzystanie zabiegali genetycy i hodowcy już od wielu lat. Zabiegi te były stosunkowo skuteczne, ponieważ ocenia się, że do tej pory tylko w zakresie odporności wprowadzono do pomidora z gatunków nieuprawnych 16 z istniejących tam 30 odporności na różne choroby (80). Pomimo tego istnieje jeszcze wiele odporności i innych cech, które wprowadzone do pomidora znacznie zwiększyłyby atrakcyjność jego uprawy. Ponadto olbrzymia i pożądana przez genetyków, hodowców i fizjologów zmienność tkwi w blisko spokrewnionym, bardzo zróżnicowanym i licznym rodzaju *Solanum*. Niektóre gatunki interesujące ze względu na wprowadzenie nowych cech do pomidora podano w tab. 1.

Tabela 1

**Cechy przydatne w ulepszeniu pomidora uprawnego
występujące u wybranych gatunków z rodzaju *Lycopersicon* lub *Solanum***

Gatunek	Cecha	Author
<i>L. pennelli</i>	tolerancja na zasolenie	Jones (1987)
<i>L. hirsutum</i>	tolerancja na zasolenie i obniżoną temperaturę	Jones (1987)
<i>L. chmielewskii</i>	tolerancja na zasolenie i obniżoną temperaturę	Jones (1987)
<i>L. cheesmanii</i>	wysoka gęstość miąższu owoców	Garvey i Hewitt (1984)
<i>S. lycopersicoides</i>	odporność na owady, przymrozki, choroby (wirusowe, <i>Botrytis</i>), nowe geny wpływające na rozwój	Rick (1987)
<i>L. rickii</i>	odporność na owady, przymrozki, choroby wirusowe, <i>Botrytis</i>	Rick (1987)
<i>S. juglandifolium</i>	odporność na choroby korzeni	Rick (1987)
<i>L. hirsutum</i>	14 różnych odporności	Rick (1982)

Główna trudność w wykorzystaniu tych cech w hodowli wynikała z barier krzyżowalności pomiędzy kompleksem *peruvianum* i *esculentum*. Niektóre dzikie gatunki syntetyzują również bardzo poszukiwane substancje, np. *L. hirsutum* f. *glabratum* tworzy 2-tridecanol – substancję toksyczną dla trzech głównych szkodników (96), natomiast *S. lycopersicoides* ma wysoką zawartość tomatyny (70), najprawdopodobniej również odpowiedzialnej za odporność na owady. Gatunki te mogą być źródłem surowca do produkcji tych substancji przez przemysł lub źródłem tej cechy w zabiegach biotechnologicznych. U mieszańców pomidora z *L. pennelli* wykazano z kolei, że odporność na szkodnika *Macrosiphum euphorbiae* w pokoleniu F₂ jest związana z obecnością estrów cukrowych (27). Sam tylko gatunek *S. lycopersicoides* budzi zain-

teresowanie z następujących powodów: 1) odporność na przymrozki i znacznie obniżone, w stosunku do pomidora, optimum temperaturowe; 2) duża liczba nowych genów jak – trzy geny Frub, Fr1 i Lac – wpływające na kształt liścia i odpowiedzialne najprawdopodobniej za podstawowe różnice między *Lycopersicon* i *Solanum*, gen DLs – regulujący wrażliwość na długość dnia i gen Wa – warunkujący białe pylniki; 3) odporność na owady (również u mieszańców *L. esculentum* x *S. lycopersicoides*) – i wspomniana już wyjątkowo wysoka zawartość tomnatyny; 4) długowieczny, krzaczasty typ wzrostu, nowa cecha o nieznanym potencjale, ale powszechna w *Solanum*; 5) odporność na choroby. Za pomocą kultur zarodkowych uzyskano mieszańce *L. esculentum* i *S. Lycopersicoides* (81), które następnie krzyżowano z *L. pennelli* uzyskując płodne potomstwo diploidalne i aneuploidalne z niektórymi cechami *S. lycopersicoides*. Próbę pokonania sterility mieszańców somatycznych pomidora z *S. lycopersicoides* podjęli Gledzie i inni (1989) rozpoczynając program wstecznego fuzjowania mieszańców z formami uprawnymi.

Innym ciekawym gatunkiem jest *L. hirsutum*, który rośnie w Andach Peruwiańskich na wysokości do 3200 m n.p.m, gdzie często minimalna temperatura dnia nie przekracza 6°C. Odmianny ten charakteryzuje się tolerancją na niską temperaturę w odniesieniu do wielu właściwości fizjologicznych, jak: kiełkowanie nasion, przeżywalność siewek i rozwój chlorofilu, pobieranie aminokwasów przez tkankę liściową, kiełkowanie pyłku i zdolność do zapłodnienia.

Gatunki z rodzaju *Lycopersicon* nadają się doskonale do badań nad ewolucją systemów rozmnażania. Dziewięć znanych podgatunków, stosownie do sposobu rozmnażania, klasyfikuje się w 4 grupy: autogamiczne – *L. esculentum*, *L. cheesmanii*, *L. parviflorum*; fakultatywne (samopłodne) – *L. pimpinellifolium*, *L. chmielewski*; fakultatywne (samopłodne i samoniezgodne) – *L. hirsutum*, *L. pennelli*, *L. peruvianum*; allogamiczne (samoniezgodne) – *L. chilense*. Adams i Quiros (1985) uzyskali ciekawy materiał do takich badań regenerując mieszańce somatyczne samoniezgodnej formy *L. peruvianum* z samoniezgodnym *L. pennelli*. Ustalono doświadczalnie, że przejście od samoniezgodności do samozgodności jest znacznie łatwiejsze niż odwrotnie (79). Różnica pomiędzy samoniezgodnością i samozgodnością była warunkowana dwoma głównymi genami, a pozostałe cechy związane z każdym z systemów były poligeniczne. Gatunki te wykorzystano do analizy systemu samoniezgodności, ustalając, że loci S u *L. peruvianum* jest położony w pobliżu centromeru na chromosomie 1, a odpowiednie białka znamienia słupka wyizolowano i zsekwencjonowano koniec aminowy (59).

Rodzaj *Lycopersicon* dostarcza bardzo dobrego materiału do badań nad kontrolą introgresji genów z jednego gatunku do drugiego. Za pomocą kultur *in vitro* daje się ze sobą krzyżować wszystkie dziewięć gatunków, a wspomniane poprzednio mapy genetyczne i molekularne umożliwiają dokładne śledzenie zmian w genomie. Prace takie zostały zresztą podjęte z wybraną formą uprawną recesywną w stosunku do wielu genów markerowych i wysokowsobną formą *L. pennelli*. Krzyżowanie wsteczne z *L. esculentum* i analiza pokoleń BC (78) wykazały, że allele formy uprawnej są faworyzowane i część rekombinacji w obszarach pericentrycznych została silnie zredukowana w pokoleniach od pierwszego do trzeciego BC. W następnych pokoleniach pozostała na stałym poziomie.

6. Mieszańce somatyczne

Dzięki rozwinięciu technik izolacji i kultury protoplastów można wytwarzać u pomidora różne mieszańce somatyczne, pełne i asymetryczne – łącznie z cybrydami (tab. 2). Pomidor był składnikiem jednego z pierwszych międzyrodzajowych mieszańców somatycznych, niemożliwych do uzyskania na drodze generatywnej, gdzie zregenerowano rośliny (60). Do dziś służą one jako materiał do przeprowadzania różnych badań. Wiele gatunków rodzaju *Lycopersicon* krzyżuje się na drodze generatywnej za pomocą kultur zarodków i stąd powstaje bardzo interesujące pole do odpowiednich badań porównawczych, np. mieszańce somatyczne a mieszańce generatywne.

Tabela 2

Mieszzańce somatyczne gatunków z rodzaju *Lycopersicon*

Gatunki użyte do fuzji	Efekt fuzji	Autorzy
<i>L. esculentum</i> + <i>S. tuberosum</i>	rośliny	Melchers i in. (1978) Shepard i in. (1983)
<i>L. esculentum</i> + <i>L. pennelli</i>	rośliny	O'Connell i Hanson (1985)
<i>L. esculentum</i> + <i>S. rickii</i>	rośliny	O'Connell i Hanson (1986)
<i>L. esculentum</i> + <i>S. lycopersicoides</i>	rośliny	Handley i in. (1986)
<i>L. esculentum</i> + <i>L. pennelli</i>	rośliny (hybrydy)	Melzer i O'Connell (1990)
<i>L. esculentum</i> + <i>L. peruvianum</i>	rośliny	Kinshara i in. (1986) Wijbrandi i in. (1988) Sah i in. (1990)
<i>L. peruvianum</i> + <i>L. pennelli</i>	rośliny	Adams i Quiros (1985)
<i>L. esculentum</i> + <i>S. nigrum</i>	rośliny	Guri i in. (1988)
<i>L. peruvianum</i> + <i>Petunia hybrida</i>	rośliny	Tabezadeh i in. (1985)

Ponieważ znane są mutanty pomidora odporne na różne substancje (antybiotyki, herbicydy, substancje nieorganiczne) to po fuzji protoplastów istnieją różne możliwości selekcji mieszańców. Na przykład mieszańce somatyczne *L. peruvianum* i *L. pennelli* selekcjonowano na podstawie zdolności do regeneracji pierwszego i odporności na G-418 (2-dezoksystreptamina) drugiego gatunku (1). Identyfikację mieszańców ułatwiają również bardzo liczne markery izoenzymatyczne i RFLP. Mapa RFLP została wykorzystana m.in. do identyfikacji 200 roślin BC₁ krzyżówki *L. esculentum* x *L. pennelli* za pomocą 70 fragmentów RFLP (99), somatycznych hybrydów *L. esculentum* + *L. lycopersicoides* (63). Obecność ponad 30 loci analizowano u mieszańców *L. esculentum* + *L. pennelli* stosując RFLP i izoenzymy (61). Analiza ta wykazała, że mieszańce były asymetryczne i zawierały chloroplastowy genom pomidora, a mitochondrialny *L. pennelli*. Natomiast mieszańce *L. esculentum* + *S. rickii* zawierały genom chloroplastowy *S. rickii*, a genom mitochondrialny w większości pochodził od pomidora (66). Mieszańce somatyczne wykazują nowe genomy mitochondrialne (66,67,82) i zredukowane mtDNA takich mieszańców jest raczej regułą aniżeli wyjątkiem (32). Mieszańce somatyczne *L. esculentum* + *L. peruvianum* miały wiele pośrednich cech morfologicznych i biochemicznych oraz jakościowo nowy genom mt, podczas gdy genom ct pochodził od jednego lub drugiego rodzica (82).

7. Techniki kultury *in vitro*

Techniki kultury *in vitro* są istotnym elementem wielu badań fizjologicznych i biochemicznych, a szczególne znaczenie mają w genetyce i hodowli roślin. Niektóre z nich są szeroko wykorzystywane w praktyce ogrodniczej. Znalazły również zastosowanie w badaniach fitopatologicznych, a szczególnie w pracach nad penetracją i replikacją wirusów, kulturą obligatoryjnych pasożytów, testowaniu fitotoksyn i wielu innych (12). Wszystkie te techniki są bardzo dobrze opracowane u pomidora tak, że można je szeroko wykorzystywać po adaptacji do własnych warunków eksperymentalnych. U formy uprawnej istnieją znaczne różnice w zdolności do regeneracji roślin poprzez kalus pomiędzy odmianami, obserwowane również u gatunków dzikich, np. *L. peruvianum*.

Kultury niedojrzałych zarodków wykorzystano już w 1944 r. do otrzymania międzygatunkowych mieszańców *L. esculentum* x *L. peruvianum*, a później mieszańców *L. esculentum* x *L. lycopersicoides* (78), *L. esculentum* x *L. chilense*. Zarodki mieszańców *L. esculentum* x *L. peru-*

vianum nie dojrzewają *in vitro*, a kultura *in vitro* w pracy Thomasa i Pratta (1981) była również nieskuteczna – z około 500 zarodków nie otrzymano żadnej rośliny. Natomiast, około 4% zarodków wytworzyło kalus z którego zregenerowały samosterylne rośliny, ale tworzące nasiona po skrzyżowaniu z innymi roślinami F₁. Jest to bardzo dobry przykład wykorzystania danej techniki nie wprost, tylko pośrednio.

Kultury kalusowe pomidora są również od dawna opracowane i regeneracja roślin zachodzi chociaż jest w znacznym stopniu zależna od genotypu rośliny dawcy (53,62,92). Regenerację roślin z kultur kalusowych inicjowanych z różnych eksplantatów rośliny opisało wielu autorów (71,2,69,19,51,100). Kultury pylnikowe pomidora, jako sposób uzyskiwania haploidów, są stosunkowo mało skuteczne, chociaż pierwsze haploidy otrzymano już w 1972 r. i to zarówno w kulturze pylników, jak i mikrospor w kulturze niańki. Reakcja pylników była zależna od genotypu, a szczególnie pozytywny wpływ miał gen recesywny *ms-10*³⁵. Liczba uzyskiwanych roślin była bardzo mała, prawdopodobnie z powodu przerostu wnętrza pylnika, przez kalusujące komórki ściany. Regeneracja z tkanek somatycznych haploidów daje rośliny o ha- di- i tetraploidalnej liczbie chromosomów, a udział di- i/lub tetraploidów zależy od właściwości wyjściowej rośliny haploidalnej (50).

Kultury protoplastów nie dawały początkowo dobrych wyników (93,47). Stało się to powodem do podjęcia przez kilku badaczy programu hodowli linii, które dobrze nadawałyby się do pracy technikami *in vitro*, tzn. miałyby wysoką zdolność do regeneracji, przede wszystkim z protoplastów oraz posiadałyby markery łatwe do rozpoznania w kulturze. Linie takie wytworzono z krzyżówek z *L. peruvianum* (95,49). Dopiero w połowie lat osiemdziesiątych uzyskano w kulturze protoplastów duży postęp. Było to wynikiem opracowania takich procedur izolacji i kultury, które uwzględniały specyficzne wymagania pomidora (90). Efektywność posiewu przekraczała 80%, a 1–22% kalusów było zdolnych do regeneracji roślin.

Zdolne do regeneracji protoplasty uzyskiwano także z linii komórkowej *L. pennelli* odpornej na G418 oraz z tkanki walca osiowego mieszańca *L. esculentum* x *S. lycopersicoides* (26). Rośliny zregenerowane z protoplastów były przeważnie tetraploidalne (50), chociaż u *L. pennelli* tetraploidy stanowiły 8%, a reszta była diploidami (90). Podobnie było z roślinami zregenerowanymi z protoplastów mieszańca *L. esculentum* x *L. pennelli*, wśród których diploidy i oktoploidy stanowiły średnio po 16%, a tetraploidy 68% (67).

L. peruvianum w przeciwieństwie do formy uprawnej wykazał bardzo dużą zdolność do regeneracji z protoplastów (1) oraz bardzo ciekawą właściwość tworzenia zarodków somatycznych. Z krzyżówki (*L. peruvianum* x *L. esculentum*) x *L. esculentum* wyselekcjonowano dwa genotypy Msk8 i Msk9 o bardzo dużej zdolności do regeneracji pędów z protoplastów i ustalonych kultur kalusowych (42,43). Stwierdzono jednocześnie, że cecha ta była uwarunkowana dwoma genami dominującymi (48).

8. Zmienność somaklonalna i selekcja mutantów w kulturach *in vitro*

Te techniki kultury *in vitro*, w których występuje faza kalusa powodują powstawanie komórek, tkanek i roślin zmienionych genetycznie i zmienność ta została nazwana zmiennością somaklonalną. Występuje ona również wśród roślin pomidora zregenerowanych z fragmentów liści (16) i liścieni (24). Otrzymano mutanty o zmienionych liściach, typie wzrostu, barwie owoców, odporne na rasę 2 *Fusarium* i, nie opisanego do tej pory, mutantą *mottled* (16). Również rośliny *L. peruvianum*, zregenerowane z węzłów łodygi i pylników, wykazywały zmienność w wielkości szparek i ziaren pyłku, wystąpiły rośliny tetraploidalne oraz diplo-tetraploidalne chimery pery- i meryklinarne (87). Ponadto wśród roślin zregenerowanych z haploidów występuje większa zmienność liczby chromosomów niż u zregenerowanych z diploidów (50).

Istnienie zmienności somaklonalnej umożliwia selekcję różnych mutantów, również w kulturach komórek i tkanek diploidalnych. Wyselekcjonowane w kulturach *in vitro* mutanty podano w tab. 3.

Tabela 3

Mutanty wyselekcjonowane w kulturach *in vitro* w rodzaju *Lycopersicon*

Wyselekcjonowana cecha	Dziedziczenie
Paraquat (herbicyd)	tak, ekspresja tylko w kalusie
Kwas fusariowy (odporność na rasę <i>F. oxysporum</i>)	tak, 1 gen dominujący
Odporność na streptomycynę (<i>L. peruvianum</i>)	tak, cytoplazmatycznie
Odporność na zasolenie	nie określone

9. Analiza molekularna struktury i ekspresji genów

Pomidor dostarcza doskonałego materiału do badań nad regulacją genów związanych z dojrzewaniem owoców, tym bardziej, że wyizolowano mutanty o zmienionej ekspresji genów odpowiedzialnych za tę cechę (86). Badano ekspresję genów plastydowych podczas dojrzewania owoców, wykazując malejącą aktywność genów kodujących białka fotosystemu I (*psaA*), fotosystemu II (*psbA*, *psbB*, *psbC*, *psbD* oraz stromy *rbcl*) (77) oraz plastydowego tRNA podczas różnicowania od chloroplastów do chromoplastów (70). W chromoplastach nie ulegały ekspresji geny *psaA*, *psbC*, *psbD* i *rbcl*. Natomiast, w czerwonych owocach występowała stosunkowo wysoka zawartość mRNA i białka 32KD (białka wiążącego herbicydy) genu *psbA*. Prace innych badaczy (28,77) wykazały, że aktywność niektórych z tych genów ulega okresowym zmianom, a ich działanie podlega skoordynowanemu systemowi regulacji przedstawionemu przez Griersona (1986). Jednocześnie wykazano, że podczas dojrzewania nie zachodzą zmiany w strukturze mtDNA (40,39). Wiadomo również, że wiele procesów związanych z dojrzewaniem jest zainicjowanych przez etylen (54,6) i są to m.in. akumulacja barwników karotenowych, przekształcenie chloroplastów w chromoplasty, wzmożona aktywność genów kodujących enzymy degradujące ściany komórkowe. Jeden z genów indukowanych etylenem został wyizolowany jako cDNA i wykazywał podobieństwo sekwencji z genem białka inhibitora proteiny indukowanego zranieniem (52). Wyizolowany został również inny gen PG i wykazano 2000 więcej jego mRNA w owocach dojrzewających niż zielonych (14). Badano również organizację i ekspresję genów związanych z dojrzewaniem owoców u dwóch mutantów Nr (*Neverripe*) i rin (*ripening inhibitor*) (45). Stwierdzono, że gen PG ulega ekspresji u rin, natomiast u Nr ekspresja jego, podobnie jak czterech innych genów dojrzewania, jest słabsza. Egzogenny etylen przywracał wysoką ekspresję genów inhibowanych w rin – poza genem PG, jednak nie przywracał normalnego dojrzewania owoców rin. Jednocześnie wskazano, że starzenie liści i dojrzewanie owoców są wynikiem ekspresji podobnych genów, których istotnym czynnikiem kontrolującym jest etylen (13), a jeden z genów dojrzewania owoców ulegał również ekspresji pod wpływem zranienia (37). Dalsze badania ekspresji genów odpowiedzialnych za przekształcanie chloroplastów w chromoplasty wykazały, że supresja transkrypcji niektórych z nich jest spowodowana metylacją (46).

Wyizolowano również zestaw cDNA dla genów ulegających ekspresji w pylniku (56). Z zestawu tego scharakteryzowano dwa geny LAT56 i LAT59, ulegające silnej ekspresji w dojrzałym pylniku i pyłku (97). Geny te wykazywały duże podobieństwo do genu kodującego pektolizę z patogenicznej bakterii *Erwinia*. Wspomniany gen PG został wyizolowany, zmapowany i zse-

kwencjonowany. Dokładnie zbadano jego organizację molekularną, a następnie jego część promotorową szufowano z genem CAT (transferaza chloramfenikolu) (8). Konstrukt ten wprowadzono do pomidora, a zregenerowane rośliny wykazywały ekspresję CAT w dojrzałych owocach, ale nie w owocach niedojrzałych, liściach i korzeniach. Była to więc ekspresja organowo- i tkankowospecyficzna. Inna konstrukcja genu chimeralnego PG również ulegała ekspresji w owocach mutantu rin (25). Wszelkstronnej analizie molekularnej został również poddany kompleksowy loci Cab-1 zawierający zgrupowane cztery geny kodujące polipeptyd wiążący chlorofil a/b (3). Stwierdzono, że wewnątrz tego kompleksu jest element powtarzalny CRL, występujący w 30 kopiach w genomie pomidora uprawnego i wszystkich innych gatunków rodzaju *Lycopersicon* oraz *S. lycopersicoides* i *S. tuberosum*. Trzeci z intronów genu Cab-7, zlokalizowanego na chromosomie 10, zawierał sekwencję insercyjną obszaru kodującego, chloroplastowego genu psbG (75). Stwierdzono jednocześnie, że sekwencja ta występuje u wszystkich gatunków rodzaju *Lycopersicon*, ale nie w rodzajach pokrewnych, tj. *Solanum*, *Petunia*, *Nicotiana*. Inne prace nad molekularną charakterystyką tego kompleksu doprowadziły do izolacji i zsekwencjonowania genów Cab-6B i Cab-6A oraz ustalenia ich pozycji na chromosomie 5 i wzajemnej odległości wynoszącej przynajmniej 7 Kz (76). Geny te oznaczono jako typu I PSI CAB i ustalono, że ich silna ekspresja ma miejsce w oświetlonej tkance liścia, a słabsza w innych zielonych organach. Wyizolowano oraz zsekwencjonowano cDNA polipeptydu fotosytemu I i określono szereg właściwości tego białka (36), a także geny białka CP24 będącego składnikiem anten chlorofilowych PSII (83).

Scharakteryzowano również cDNA dziewięciu genów ulegających ekspresji w niedojrzałym słupku (przed mejozą) i dojrzałym (przy zapyleniu) (23). Jeden z genów ulegał ekspresji tylko w głównej tkance słupka, a drugi – tylko w dwóch z trzech warstw komórek zalążni – w czasie krótszym niż 8 dni. Pomidor jest pierwszym gatunkiem uprawnym, u którego zmapowano metodami biologii molekularnej loci odpowiedzialne za cechę ilościową – QTLs (*Quantitative trait loci*) (66), stwarzając tym samym szansę do szybkiego wyizolowania tego fragmentu, rozciągającego się na obszarze tylko 3 cM (centymorganów).

10. Transformacja

Uzyskiwanie roślin o nowych cechach będących wynikiem włączenia obcego genu do genomu biorcy jest bardzo intensywnie rozwijającym się działem inżynierii genetycznej. Owa intensywność charakteryzuje też prace nad transformacją u pomidora. Jest to wynikiem wspomnianych wcześniej walorów pomidora jako obiektu badań, ale niemniej istotne znaczenie miało opracowanie prostej metody regeneracji roślin z krążków liściowych (2,51), wykorzystanej do transformacji (38,57,47). Konstrukty wprowadzone do tej pory do pomidora i ich zachowanie się w transformantach podano w tab. 4, poza przypadkiem wprowadzenia chimeralnego genu fitochromu owsa (9).

Stopień ekspresji tego genu był różny co przejawiało się w zróżnicowaniu fenotypowym roślin. Natomiast, pochodzący z bakterii gen oporności na herbicyd glifosfat wprowadzony, po modyfikacji, do pomidora ulegał ekspresji nadając roślinom oporność na tę substancję (17).

Pomidor jest pierwszą rośliną uprawną do której wprowadzono nowy gen o istotnym znaczeniu gospodarczym, i gdzie wykazano, że zabieg ten poprawił wartość roślin. Chodzi o rośliny odporne na wirusa mozaiki tytoniowej, które nabyły odporność na skutek transformacji genu białka płaszczka wirusa, co dało minimalne porażenie plantacji i ok. 30% wyżkę plonu (65). U pomidora nie stwierdzono dotychczas występowania transpozonów. Element AC z kukurydzy został wprowadzony do tego gatunku za pomocą *Agrobacterium tumefaciens* i ulegał transpozycji w komórkach liścia, nie stwierdzono też uruchomienia Ds u transformantów (88).

Tabela 4

Różne konstrukcje genów wprowadzone do pomidora na drodze transformacji

Przenoszona konstrukcja	Technika przeniesienia	Regeneracja roślin	Ekspresja przenoszonych genów	Dziedziczenie mendelowskie	Autorzy
5'nos/npt II	Ti	+	+	+	McCormick i in. (1986)
5'rbcS/npt II					
5'nos/npt II	Ri	korzenie włosowate	+	-	Simpson i in (1986)
5'nos/npt II	Ti	+	+	+	McKnight i in. (1987)
5'nos/npt II	Ri	+	+	+	Chyi i Philips (1987) Sukhapinda i in. (1987)
5'mas/EPSP	Ti	+	+	+	Fillatti i in. (1987)
5'nos/npt II	DGT	+	+	ND	Jongsma i in. (1987) Koorneef i in. (1986)
		+	+	ND	Bird i in. (1988)
pnosCAT	elektroporacja				
pCaMVCAT		-	+	ND	Tsukada i in. (1989)

Skróty: mas – gen syntazy mannopinowej; DGT – bezpośrednie przeniesienie genu; nos – gen syntazy nopolinowej; npt II – gen fosfotransferazy neomycynowej II; pnos CAT – gen acetylotransferazy chloramfenikolu z promotorem genu nos pCaMVCAT – gen acetylotransferazy chloramfenikolu z promotorem genu 35S wirusa mozaiki kalafiora; rbcS – gen małej podjednostki rybulozobifosfocarboxylazy; EPSP – gen 3-fosfo 5-enolpirogrofonoszkimianu, ND – nie określono

Literatura

- Adams T. L., Quiros C. F., (1985), *Plant Sci.*, 40, 206–219.
- Behki R. M., Lesley S. M., (1976), *Can. J. Botany*, 2409–2414.
- Bernatzky R., Tanksley S. D., (1986), *Genetics*, 112, 887–898.
- Bernatzky R. M., Tanksley S. D., (1986a), *Theor. Appl. Genet.* 72, 314–321.
- Bender W., Spierer P., Hogness D. S., (1983), *J. Mol. Biol.*, 168, 17–33.
- Biale J. B., Young R. E., (1981), in: *Recent advances in the biochemistry of fruit and vegetables*, eds. J. Friend, M. J. C. Rhodes., Academic, London, 1–39.
- Biasini M. G., Sala F., (1987), *Theor. Gen. Genet.*, 74, 733–738.
- Bird C. R., Smith C. J. S., Ray J. A., Moureau P., Bevan M. W., Bird A. S., Hughes S., Morris P. C., Grierson D., Schuch W., (1988), *Plant Molec. Biol.*, 11, 651–662.
- Boylan M. T., Quail P. H., (1989), *The Plant Cell*, 1, 765–773.
- Carle G. F., Frank M., Olson M. V., (1986), *Science*, 232, 65–68.
- Chyi Y. S., Philips G. C., (1987), *Plant Cell Rep.*, 6, 105–108.
- Daub M. E., (1986), *Ann. Rev. Phytopathol.*, 24, 159–186.
- Davies K. M., Grierson D., (1989), *Planta*, 179, 73–80.
- Della Penna D., Alexander D. C., Benett A. B., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83, 6420–6424.
- Ecochard M., Ramanna M. S., (1969), *Genetica*, 40, 181–190.
- Evans D. A., (1987), in: *Tomato Biotechnology*, D. J. Nerivs, R. A. Jones, eds. Alan Kiss Inc., New York, 59–69.

17. Fillatti J. J., Kiser J., Rose R., Comaing L., (1987), *Biotechnology*, 5, 726–730.
18. Firoozabady E., (1983), *Science*, 220, 1049–1051.
19. Frankenberger E. A., Hasegawa P. M., Tighelaar E. C., (1981), *Zeitschr. Pflanzenphysiol.*, 102, 233–242.
20. Galbraith D. W., Harkins K. R., Maddox J. M., Ayres N. M., Sharma D. F., (1983), *Science*, 220, 1049–1051.
21. Ganai M. W., Young N. D., Tanksley S. D., (1989), *Mol. Gen. Genet.*, 215, 395–400.
22. Garcia-Reina G., Moreno V., Luque A., (1988), *J. Plant. Physiol.*, 133, 1–60.
23. Gasser Ch. S., Budelier K. A., Smith A. G., Shah D. M., Fraley M., (1989), *The Plant Cell*, 1, 15–24.
24. Gavazzi G., Tonelli C., Todesco G., Arreghini E., Raffaldi F., Vecchio F., Barbuzzi G., Biasini M. G., Sala F., (1987), *Theor. Appl. Genet.*, 74, 773–738.
25. Giovannoni J. J., Della Penna D., Bennett A. B., Fisher R. I., (1989), *The Plant Cell*, 1, 53–63.
26. Gleddie S., Keller W. A., Poysa V., (1989), *The Cell Rep.*, 8, 21–24.
27. Goffreda J. C., Steffens J. C., Mutshler M. A., (1990), *J. Amer. Hort. Sci.*, 115(1), 161–165.
28. Grierson D., Slater A., Speirs J., Tucker G. A., (1985), *Planta*, 163, 263–271.
29. Grierson D., Maunders M. J., Slater A., Ray J., Bird C. R., Schuch W., Holdsworth M. J., Tucker G. A., Knapp J. E., (1986), *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, B 314, 339–410.
30. Guri A., Lewi A., Sink K. C., (1988), *Mol. Gen. Genet.*, 212, 191–198.
31. Handley L. W., Nickels R. L., Cameron M. W., Moore P. P., Sink K. C., (1986), *Theor. Appl. Genet.*, 71, 691–697.
32. Hanson M. R., (1984), *Mol. Cell. Biol.*, 1, 33–52.
33. Hanson M. R., Conde M. F., (1985), *Int. Rev. Cytol.*, 94, 213–267.
34. Hause B., Baudouf F., Stock K., Wasternok C., Metzclaff M., (1986), *Curr. Genet.*, 10, 785–790.
35. Helentjaris T., King G., Slocum M., Siedenstrang C., Wegman S., (1985), *Plant. Mol. Biol.*, 5, 109–118.
36. Hoffman N. E., Pichersky E., Malik V. S., Ko K., Cashmore A. R., (1988), *Plant. Mol. Biol.*, 435–445.
37. Holdsworth M. J., Schusch W., Grierson D., (1988), *Plant. Mol. Biol.*, 11, 81–88.
38. Horsch R. B., Fry J. E., Hoffman N., Eicholtz D., Rogers S. G., Fraley R. T., (1985), *Science*, 227, 1229–1231.
39. Hunt C. M., Hardison R. C., Boyer C. S., (1986), *Plant. Physiol.*, 82, 1145–1147.
40. Iwatsuki N., Harai A., Asaki T., (1985), *Plant. Cell. Physiol.*, 26, 599–601.
41. Johnes R. A., (1987), in: *Tomato Biotechnology*, D. J. Nevins, R. A. Jones, eds. Alan R. Riss Inc., New York, 125–137.
42. Jongsma M., Koornneef M., Zabel P., Hille J., (1987), *Plant Molec Biol.*, 8, 383–394.
43. Khush G. S., Rick C. M., (1968), *Chromosoma*, 23, 542–484.
44. Kinshara A., Patnaik S. N., Cocking E. C., Power J., (1986), *J. Plant Physiol.*, 125, 225–234.
45. Knapp J., Moureau P., Schuch W., Grierson D., (1989), *Plant Mol. Biol.*, 12, 105–116.
46. Kobayashi H., Ngernprasirtsiri J., Akazawa T., (1990), *The EMBO J.*, 9(2), 307–313.
47. Koornneef M., Hahnart C. J., Jongsma M., Toma J., Weide R., Abel P., Hille J., (1986), *Plant Sci.*, 45, 201–208.
48. Koornneef M., Hahnart C. J., Martinelli L., (1987), *Theor. Appl. Genet.*, 74, 633–641.
49. Koornneef M., Jongsma M., Weide R., Zabel P., Hille J., (1987), in: *Tomato Biotechnology*, D. J. Nevins, R. A. Jones, ed. Alan R. Riss Inc., New York, 169–178.
50. Koornneef M., Schoemakers H. C. H., Wijbrandi J., (1989), *Euphytica*, 43, 179–186.
51. Kurtz S. M., Lineberger R. D., (1983), *J. Amer. Hort. Sci.*, 108, 710–714.
52. Lincoln J. E., Cordes S., Read E., Fischer R. I., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84, 2793–2797.
53. Locky R. D., (1964), *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 84, 491–500.
54. Lyons J. M., Pratt H. K., (1964), *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 84, 491–500.
55. McClean P. E., Hanson M. R., (1986), *Genetics*, 112, 649–667.
56. McCormick S., Smith A., Gasser C., Sachs K., Hinhee M., Horsch R., Fraley R., (1987), in: *Tomato Biotechnology*.
57. McCormick S., Niedermeyer J., Fry J., Barnason A., Horsch R., Fraley R., (1986), *Plant Cell Rep.*, 5, 81–84.
58. McKnight T. D., Lillis M. T., Simpson R. B., (1987), *Plant Mol. Biol.*, 8, 439–445.
59. Mau S. L., Williams E. G., Atkinson A., Anderson M. A., Cornish E. C., (1986), *Planta*, 169.
60. Melchers G., Sacristan M. D., Holder A. A., (1978), *Carlsberg Res. Commun.*, 43, 203–208.
61. Melzer J. M., O'Connell M., (1990), *Theor. Appl. Genet.*, 79, 193–200.

62. Meredith C. P., (1979), *Zeitschr. Pflanzenphysiol.*, 945, 405–411.
63. Moore P. P., Sink K. C., (1988), *Plant Mol. Biol.*, 11, 139–145.
64. Mutschler M. A., Tanksley S. D., Rick C. M., (1987), *TGC Rep.*, 337, 5–34.
65. Nelson N. R., McCormick S. M., Delannay X., Dube P., Layton J., Anderson E. J., Kaniewska M., Proksch R. K., Horsch R. B., Rogers S. G., Fraley R. T., Beachy R. N., (1989), *Biotechnology*, 6, 403–409.
66. O'Connell M. A., Hanson M. R., (1985), *Theor. Appl. Genet.*, 70, 1–12.
67. O'Connell M. A., Hanson M. R., (1986), *Theor. Appl. Genet.*, 72, 59–65.
68. O'Connell M. A., Hosticka L. P., Hanson M. R., (1986), *Plant Cell Rep.*, 5, 276–279.
69. Ohki S., Bigot C., Mousseau J., (1978), *Plant Cell Physiol.*, 19, 27–42.
70. Oleszek W., Shanon S., Robinson R. W., (1986), *Acta Soc. Bot. Polon.*, 55, 653–657.
71. Padmanabhan V., Paddock E. F., Sharp W. R., (1974), *Can. Bot.*, 52, 1429–1432.
72. Palmer J. D., Zamir D., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 79, 5006–5010.
73. Paterson A. H., De Verna J. W., Lanini B., Tanksley S. D., (1990), *Genetics*, 124, 735–742.
74. Philips A. L., (1985), *Curr. Genet.*, 10, 153–161.
75. Pichersky E., Tanksley S. D., (1968), *Molec. Gen. Genet.*, 215, 65068.
76. Pichersky E., Hoffman N. E., Bernatzky R., Piechulla B., Tanksley S. D., Cashmore A. R., (1987), *Plant Mol. Biol.*, 9, 205–216.
77. Piechulla B., Imlay K. R. C., Gruisen W., (1985), *Plant Mol. Biol.*, 5, 373–384.
78. Rick C. M., (1971), *Stadler Symp.*, 2, 153–174.
79. Rick C. M., (1982), in: J. K. Vasil, W. R. Scowroft, K. J. Frey, eds. *Plant Improvement and Somatic Cell Genetics*, Academic Press, New York. 1–28.
80. Rick C. M., (1987), in: *Tomato Biotechnology*, D. J. Newins, R. A. Jones, eds. Alan R. Riss Inc. New York, 17–26.
81. Rick C. M., De Verna W. D., Chetelat R. T., Stevens M. A., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 83, 3580–3583.
82. San L. H., Vedel F., Sihachakr D., Remy R., (1990), *Gen. Genet.*, 221, 17–26.
83. Schwartz E., Piechersky E., (1990), *Plant Mol. Biol.*, 15, 157–160.
84. Shepart J. F., Bidney D., Barsby T., Kamble R., (1983), 683–688.
85. Simpson R. B., Spieghman A., Margossian L., Mc Knight T. D., (1986), *Plant Mol. Biol.*, 6, 403–415.
86. Stevens M. A., Rick C. M., (1986), in: J. G. Atherton, J. Rudish, eds. *The Tomato Crop*. Chapman and Hall, London, New York, 35–109.
87. Sree Ramulu K., Devreux M., Ancora G., Laneri U., (1976), *Zeitschr. Pflanzenzucht.*, 76, 299–319.
88. Sukhapinda K., Spivey R., Simpson R. B., Shahin E. A., (1987), *Mol. Gen. Genet.*, 206, 491–497.
89. Tabeizadeh Z., Perennes C., Bergounioux C., (1985), *Phys. Veg.*, 22, 223–229.
90. Tan M., Dehan K., Heikin H., (1987a), *Plant Science*, 49, 43–47.
91. Tanksley S. D., Mutschler M. M., Rick C. M., (1987), in: S. J. O'Brien, eds. *Genetics Maps*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 655–669.
92. Tatchell S., Binns A., (1986), *Tomato Genet. Coop. Rep.*, 36, 35–36.
93. Tewes A., Glund K., Walther R., Reinbothe H., (1984), *Zeitschr. Pflanzenphys.*, 113, 141–150.
94. Tsukada M., Kusano T., Kitagawa Y., (1989), *Plant Cell Physiol.*, 30(4), 599–603.
95. Wijbrandi J., Vos J. G. M., Koornneef M., (1988), *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 12, 192–196.
96. Williams W. G., Kennedy G. G., Yamamoto R. T., Thacker J. D., Bordner J., (1980), *Science*, 207, 888–889.
97. Wing R. A., Yamaguchi J., Larabell S. K., Ursin V. M., McCormick S., (1989), *Plant Mol. Biol.*, 14, 17–28.
98. Yoder J. I., Palys J., Alpert K., Lassner M., (1988), *Mol. Gen. Genet.*, 213, 291–296.
99. Young N. D., Tanksley S. D., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, 77, 95–101.
100. Zelcer A., Soferman O., Izhar S., (1984), *J. Plant Physiol.*, 115, 211–215.

Tomato an “useful *Drosophila*” of modern biology

Summary

Tomato is an important cultivated plant and a favorite model system for modern biological studies. Many wild species are crossable with tomato giving the possibility to develop various areas of investigations like evolution of mating, gene introgression, or developmental gene regulation. Tomato is relatively favourable for *in vitro* culture of various tissues and organs. That makes it possible to incorporate these techniques into various research programs and the selection of new mutants and recombinants. Various nuclear and cytoplasmic genes responsible for important functions have been isolated and characterized at molecular level.

Adres dla korespondencji:

Stefan Malepszy, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin Ogrodniczych, SGGW-AR, ul. Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa.