



Cytogenetyczne badania struktury genomów poliploidalnych

Jolanta Małuszyńska

Katedra Anatomii i Cytologii Roślin, Uniwersytet Śląski, Katowice

Cytogenetic analysis of genome structure of polyploids

Summary

Polyploidization is a widespread and important process in the plant evolution and in individual plant development. Polyploids are used in plant breeding programs for improving different crop varieties. Genome spontaneously becomes autopolyploid *via* chromosomal nondisjunction in mitosis or meiosis, endoreduplication, cell fusion or inhibition of cytokinesis. Polyploids also occur among regenerated plants from *in vitro* culture or during transformation process. Comparative molecular and cytogenetic genome investigations have revealed that many plant species recognised as diploids are in fact polyploids. Molecular cytogenetics methods, especially genomic *in situ* hybridization (GISH), allow for distinguishing ancestral genomes and chromosomal rearrangements appearing in the course of evolution or/and biotechnological manipulations.

Key words:

chromosomes, genome, hybridization *in situ*, molecular cytogenetics, polyploidy, plants.

1. Wstęp

Poliploidy odgrywają istotną rolę w ewolucji i praktycznej hodowli roślin. Większość gatunków roślin kwiatowych jest poliploidami pochodzącymi od dwóch lub więcej diploidalnych gatunków ancestralnych. Zainteresowanie poliploidami datuje się od przeszło pięćdziesięciu lat, ale ciągle wiele problemów nie jest wyjaśnionych lub kontrowersyjnych. Rozwój molekularnych technik pozwolił na przeprowadzenie badań, które dostarczyły nowych danych dla zrozumienia mechanizmów i znaczenia poliploidyzacji. Do ważniejszych należy zaliczyć wykazanie, że więk-

Adres do korespondencji

Jolanta Małuszyńska,
Katedra Anatomii
i Cytologii Roślin,
Uniwersytet Śląski,
ul. Jagiellońska 28,
40-032 Katowice;
e-mail:
maluszyn@us.edu.pl

biotechnologia

1 (52) 35-41 2001

szość poliploidalnych gatunków jest poliploidami wielokrotnymi oraz, że poliploidalne genomy podlegają bardzo intensywnym przemianom. Stwierdzono, że różne gatunki poliploidalne mogą mieć niezależne pochodzenie z tych samych gatunków diploidalnych (1).

Różny poziom ploidalności występuje nie tylko między gatunkami lub osobnikami, ale również między tkankami i komórkami danej rośliny lub kultury *in vitro*. Zupełnie nowym problemem jest poliploidalność roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro* i roślin transgenicznych, co może być przyczyną zmienności somaklonalnej i wyciszania genów.

2. Co to jest poliploidalność i jak powstaje?

Jądro poliploidalnej komórki zawiera więcej niż dwa haploidalne zespoły chromosomów, a zatem zawiera więcej niż dwa genomy. Genom to całkowite DNA (C) podstawowego zespołu chromosomów (x). Diploid zawiera dwa genomy i cytologicznie określany jest jako $2n = 2x$, tetraploid $2n = 4x$, gdzie n odpowiada liczbie chromosomów w gamecie. Zawartość DNA w komórce diploidalnej wynosi 2C w fazie G1 cyklu komórkowego, a w komórce tetraploidalnej 4C. Wartości te zostają podwojone w wyniku replikacji DNA w fazie S i w fazie G2 wynoszą odpowiednio 4C i 8C.

Wyróżnia się dwa podstawowe typy poliploidów: autopoliploidy – zawierają więcej niż dwa identyczne genomy; allopoliploidy – zawierają genomy pochodzące od więcej niż jednego gatunku ancestralnego. Ze względu na liczbę genomów można wyróżnić autotriploidy i allotriploidy, autotetraploidy i allotetraploidy, autoheksaploidy i alloheksaploidy itp.

W naturalnych populacjach znanych jest kilka dróg powstawania roślin poliploidalnych. Może to być podwojenie liczby chromosomów w komórce somatycznej, która stanie się potem komórką macierzystą mikro- lub megaspor. Inną drogą prowadzącą do powstawania poliploidów jest wytwarzanie przez roślinę niezredukowanych gamet, które umożliwią również powstawanie płodnych mieszańców dających początek allopoliploidom. W warunkach naturalnych częstotliwość występowania allopoliploidów jest wyższa niż autopoliploidów (2).

Poliploidalność można indukować poprzez zaburzenie dysjunkcji chromosomów w anafazie mitozy lub mejozy. Najczęściej w tym celu stosuje się traktowanie kolchicyną, która łącząc się z tubuliną, głównym składnikiem mikrotubul wrzeciona podziałowego, uniemożliwia powstanie wrzeciona, co prowadzi do powstawania jąder poliploidalnych. Ostatnio stosowane są inne związki o podobnym mechanizmie działania, jak np. oryzalina.

Komórki poliploidalne mogą powstawać również na drodze endoreduplikacji tzn. replikacji DNA poza cyklem komórkowym. Powstałe w ten sposób komórki endopoliploidalne, np. w procesie różnicowania, pobudzone do podziałów mogą dać początek poliploidalnej roślinie (3).

3. Występowanie poliploidalności

Przyjmuje się, że około 80% roślin okrytonasiennych jest poliploidami. W ewolucji i specjacji szczególnie dużą rolę odrywają allopoliploidy. Są nimi ważniejsze rośliny uprawne takie jak pszenica, kukurydza, ziemniaki, kawa, i bawełna. Prowadzone w ostatnich latach porównawcze badania genomów roślinnych (*comparative genetics*) dostarczyły danych, które bardzo zmieniły spojrzenie na zagadnienie poliploidalności i diploidalności gatunków. Wykazano, że w genomach tak różnych gatunków jak ryż i pszenica zachowany jest podobny układ genów (*colinearity; synteny*). W chromosomach gatunków należących do jednej rodziny można odnaleźć te same bloki genów, choć w różnej liczbie i innym układzie. W porównawczych badaniach genomów prowadzonych dla *Poaceae* (trawy), do których należą najważniejsze rośliny uprawne, rodziny *Brassicaceae* (krzyżowe) i *Solanaceae* (psiankowate) (4,5) wykazano, że wiele współczesnych gatunków uznawanych za diploidalne są poliploidami. Stwierdzono, że kukurydza posiada dwa różne genomy i jest tetraploidem (6). Porównując mapy genetyczne *Arabidopsis* i współczesnych gatunków *Brassica* wykazano, że gatunki takie jak *B. campestris*, *B. nigra* lub *B. oleracea* pochodzą od wspólnego heksaploidalnego przodka (7).

Dla zrozumienia procesów i przemian jakie zaszły w czasie ewolucji lub programów hodowlanych, niezbędne jest poznanie gatunków wyjściowych, ancestralnych i struktury ich genomów. Poszukiwanie gatunków ancestralnych allopoliploidów prowadzi się na bazie analizy rozmieszczenia geograficznego, cech morfologicznych, liczby chromosomów i kariotypu, a ostatnio izoenzymów i markerów molekularnych DNA. Słuszność wyboru przodków danego gatunku sprawdza się na drodze krzyżowania i próby syntezy allopoliploida i porównania go z naturalnym gatunkiem. Badania takie były prowadzone dla gatunków z rodzaju *Brassica* (rzepak), *Glycine* (soja), *Gossypium* (bawełna), *Nicotiana* (tytoń) i *Triticum* (pszenica).

Poliploidyzacja komórek somatycznych występuje powszechnie wśród roślin okrytonasiennych. Może być wynikiem endoreduplikacji, endomitoz, fuzji komórek lub zahamowania cytokinezy. Efektem takich zmian jest wystąpienie w obrębie osobnika, organu i tkanki komórek o różnej zawartości DNA (8). Poziom endopoliploidalności jest charakterystyczny dla gatunku, ale może się różnić między odmianami lub ekotypami. Rośliny, w których występuje endoreduplikacja związana z różnicowaniem komórek, określane są jako polisomatyczne (somatyczna poliploidalność). Przykładem rośliny polisomatycznej może być *Arabidopsis thaliana*, roślina modelowa w badaniach molekularnych i biologii rozwoju. Endoreduplikacja w komórkach somatycznych tej rośliny powoduje wzrost zawartości jądrowego DNA, który stopniowo w czasie rozwoju osiąga poziom 32C (9).

Wykorzystanie miksploidalnych tkanek roślinnych jako eksplantatów do kultur *in vitro* może być przyczyną wystąpienia poliploidalności w kalusie otrzymanym z tej tkanki. Indukcja podziałów komórkowych w różnicowanych komórkach w trakcie kalogenezy ujawnia poliploidalność komórek i jest pierwszą przyczyną przemian

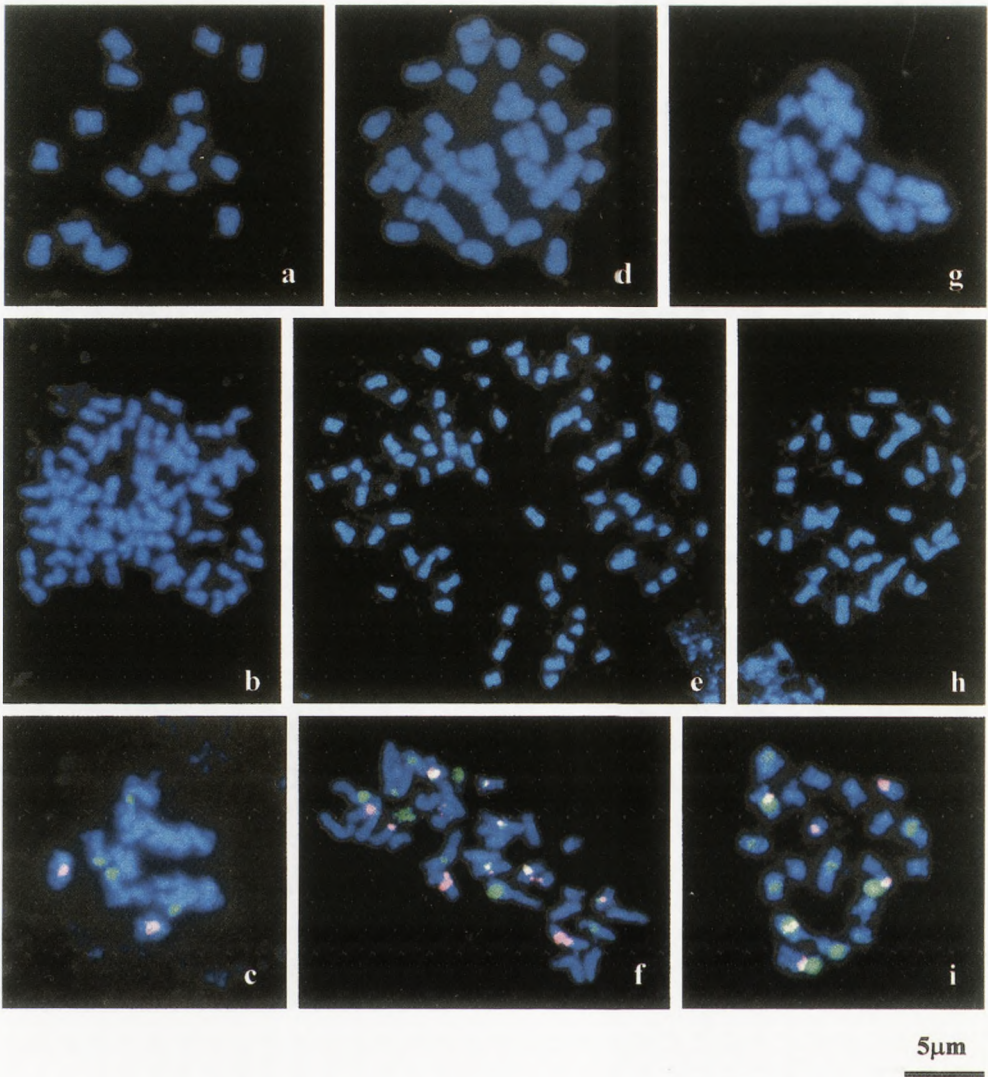
chromosomowych obserwowanych w komórkach kalusa hodowanego *in vitro*. Poliploidalność kalusa znajduje odbicie również w częstotliwości roślin poliploidalnych zregenerowanych z tego kalusa. Poliploidalność jest często przyczyną zmienności somaklonalnej obserwowanej wśród roślin zregenerowanych z kalusa.

Kalus *Arabidopsis* otrzymany z miksploidalnych eksplantatów liściowych charakteryzuje się wysokim poziomem poliploidalności już w kulturze pierwotnej. Wśród roślin zregenerowanych poliploidy stanowią znaczną część regenerantów (10). W kulturze pierwotnej eksplantatów liściowych *Brassica* poliploidalne komórki występują ze znaczną częstotliwością (rys. 1b,e,h). W doświadczeniach nad transformacją roślin *Arabidopsis*, w których wykorzystywano kultury *in vitro* stwierdzono wśród roślin transgenicznych rośliny triploidalne i tetraploidalne. Rośliny te, w odróżnieniu od roślin diploidalnych, nie wykazywały ekspresji transgenów (11).

4. Analiza chromosomów w mejozie

Tradycyjne metody cytogenetyczne, poza określaniem liczby chromosomów i ich morfologii pozwalają na obserwację zachowania się chromosomów w mejozie. Obserwacje te dostarczyły wielu cennych informacji o pochodzeniu poliploidalnych gatunków. W prawidłowo przebiegającej mejozie roślin diploidalnych chromosomy homologiczne podczas pierwszego podziału podlegają konjugacji i tworzą bivalenty. U roślin autopoliploidalnych, u których występuje więcej niż jedna para chromosomów homologicznych, w czasie mejozy powstają asocjacje więcej niż dwóch chromosomów, takie jak triwalenty, tetrawalenty, itp. Chromosomy allopoliploidów zachowują się podobnie jak u diploidów, tworząc odpowiednio więcej bivalentów pomiędzy chromosomami homologicznymi. Często jednak u allopoliploidów, które powstały w wyniku krzyżowania gatunków blisko spokrewnionych, chromosomy wykazują pewną homologię i w czasie mejozy podlegają konjugacji. Chromosomy takie nazywane są homeologicznymi. Na podstawie analizy częstotliwości powstawania w mejozie bivalentów i różnego typu multiwariantów można wnioskować o auto- lub allopoliploidalności danej rośliny. Analiza konjugacji chromosomów może być w wielu przypadkach wskaźnikiem pokrewieństw między genomami.

Znane są gatunki allopoliploidalne, które mimo homeologii zachowują się w mejozie jak diploidy. Najlepszym tego przykładem jest pszenica *Triticum aestivum* ($2n = 6x = 42$), alloheksaploid, zawierająca trzy spokrewnione genomy (AA, BB, DD), które składają się z siedmiu par chromosomów. Każdy chromosom heksaploidalnej pszenicy potencjalnie może konjugować z chromosomem homologicznym i dwiema parami chromosomów homeologicznych, jednak konjugacja odbywa się tylko między chromosomami homologicznymi, w efekcie czego powstaje 21 bivalentów. Takie zachowanie chromosomów kontrolowane jest przez gen *Ph1* zlokalizowany na chromosomie 5B (12). Geny „diploidyzaacji” mają ważne znaczenie dla zachowania żywotności allopoliploida dzięki regularnemu rozdziałowi chromosomów w anafa-



Rys. 1. Chromosomy dwóch gatunków ancestralnych *Brassica oleracea* (a,b,c); *B. campestris* (g,h,j) i allotetraploidalnego *B. napus* (d,e,f); a, d, g – chromosomy metafazowe z merystemów korzeniowych – barwienie DAPI; b, e, h – komórki poliploidalne pochodzące z kultury pierwotnej eksplantatu liściowego – barwienie DAPI; c, f, j – wynik podwójnej hybrydyzacji *in situ* z 25S rDNA (zielona fluorescencja) i 5S rDNA (czerwona fluorescencja), chromosomy zabarwione DAPI (niebieska fluorescencja); (zdjęcia mgr A. Ossowska; *in situ* hybrydyzacja dr R. Hasterok).



zie I mejozy. Mechanizmy działania tych genów mogą być wyjaśnione na drodze molekularnej. Wykorzystując porównawcze mapowanie oraz odpowiednie mutanty pszenicy podjęto próby sklonowania i scharakteryzowania genu *Ph1* u pszenicy (13). Badania cytogenetyczne wskazują, że gen *Ph1* może być odpowiedzialny za asocjację centromerów chromosomów homologicznych jeszcze przed rozpoczęciem mejozy (14).

Inną przyczyną diploidyzacji poliploidów tzn. zachowania się w mejozie jak diploid, może być eliminacja specyficznych, prawdopodobnie nie kodujących sekwencji DNA, która zwiększa różnice między chromosomami homeologicznymi uniemożliwiając ich koniugację (15).

5. Cytogenetyka molekularna jako nowe narzędzie do badania poliploidów

Metody cytogenetyki molekularnej dostarczyły nowych możliwości badania genomów, w tym genomów poliploidalnych. Jedną z ważniejszych metod, która odegrała istotną rolę w identyfikowaniu genomów ancestralnych jest genomowa *in situ* hybrydyzacja (GISH). Metoda ta polega na wykorzystaniu całkowitego genomowego DNA jednego z gatunków składowych do hybrydyzacji *in situ* z chromosomami allopoliploida powodując „malowanie” chromosomów tego genomu (16). Po raz pierwszy GISH wykorzystano w analizie naturalnie występujących poliploidów do ustalenia pokrewieństw między trawami z rodzaju *Milium* (17). Analizy z zastosowaniem GISH pozwoliły określić nie tylko gatunki wyjściowe dla allopoliploidów, ale również wykazać przemiany chromosomowe, jakie zaszły w czasie ewolucji tych gatunków. *Nicotiana tabacum* jest allotetraploidem zawierającym genomy T i S; GISH z genomowym DNA *Nicotiana glauca* pozwoliła wykryć co najmniej pięć wewnątrzgenomowych translokacji (18). Jest wiele innych przykładów badań wykorzystania genomowej hybrydyzacji *in situ* do identyfikacji genomów u różnych gatunków roślin, między innymi z rodzaju *Oryza* (19), *Dalia* (20), *Musa* (21). Szczególnie interesujące wyniki otrzymano stosując GISH do analizy chromosomów meiotycznych (20,22).

Hybrydyzacja *in situ* z wykorzystaniem genomowo lub chromosomowo specyficznych sekwencji DNA może również dostarczyć istotnych informacji o strukturze genomów poliploidalnych. Sekwencje specyficzne dla określonych chromosomów są ich znakomitymi markerami i pozwalają identyfikować chromosomy nawet w zmienionym kariotypie oraz wykrywać przemiany w liczbie i strukturze chromosomów. Jednym z często stosowanych markerów chromosomów są geny rRNA, występujące tandemowo w wielu kopiach w jednym lub kilku loci. Stosując do hybrydyzacji *in situ* dwie sondy 45S rDNA i 5S rDNA można zidentyfikować pięć par chromosomów *Arabidopsis thaliana* (23). Wykorzystując te markery do analizy genomu autotetraploidalnych roślin stwierdzono wystąpienie translokacji genów 25S-5,8S-18S rRNA w jednej parze chromosomów homologicznych. Tego typu przemiany mogą być

przyczyną preferencyjnego tworzenia bivalentów przez chromosomy tej autotetraploidalnej linii, a tym samym prowadzić do szybkiej allopoliploidyzacji autoteraploidalnej linii otrzymanej na drodze traktowania kolchicyną (24).

Innym przykładem wykorzystania rDNA jako markera chromosomów mogą być badania na allotetraploidalnych gatunkach *Brassica*, charakteryzujących się mało zróżnicowanymi i małymi chromosomami. Trzy diploidalne gatunki *B. campestris* (genom A) (rys. 1a) *B. nigra* (genom B) i *B. oleracea* (genom C) (rys. 1c) są dawcami genomów dla naturalnych gatunków *B. napus* (AC) (rys. 1b), *B. carinata* (BC) i *B. juncea* (AB) (25). Wykorzystanie rDNA jako markera chromosomów pozwoliło stwierdzić, że u allotetraploidów, przy liczbie chromosomów równej sumie chromosomów gatunków diploidalnych, wystąpiły przemiany chromosomowe, gdyż liczba loci 45S rDNA jest mniejsza niż wynika to z sumy loci u gatunków ancestralnych (26). Podwójna hybrydyzacja *in situ* z 45S i 5S rDNA dostarcza dodatkowych informacji pozwalających odróżnić w kariotypie podobne morfologicznie chromosomy NOR (*nucleolar organizer region*) pochodzące z genomu A i C (rys. 1c, f, j). Badania molekularne syntetycznych gatunków *Brassica* otrzymanych na drodze krzyżowania odpowiednich gatunków diploidalnych (genomy AB i BA oraz AC i CA) wykazały, że przemiany w genomie poliploidalnym zachodzą bardzo szybko, w ciągu kilku pokoleń i są nie tylko szybsze, ale również intensywniejsze niż u diploidów (27).

Poza przemianami genomowymi i chromosomowymi, u poliploidów występują zmiany na poziomie genu zwane wyciszaniem genów (*gene silencing*), które mają również wpływ na ich diploidyzację. Mechanizmem prowadzącym do wyciszania genów może być metylacja DNA lub tworzenie odcinków heterochromatynowych w chromosomie. Przykładem zmiany ekspresji genów może być często opisywana dominacja jąderkowa obserwowana w mieszańcach międzygatunkowych i gatunkach allopoliploidalnych (28). Polega ona na większej aktywności jednego locus rDNA w porównaniu z innymi w tej samej komórce. U pszenicy rDNA na chromosomie 1B dominuje nad 6B, który z kolei ma większą aktywność niż locus 5D. U allopoliploidalnych mieszańców żyta i pszenicy jak również u gatunku jakim jest pszenżyto geny rRNA w chromosomach pochodzących od żyta są mniej aktywne niż pozostałe loci rDNA należące do genomu pszenicy. U allopoliploidalnych gatunków *Brassica* metodami cytogenetycznymi nie stwierdzono dominacji jąderkowej w komórkach merystematycznych korzeni, chociaż była ona stwierdzona w badaniach molekularnych, które prowadzono na DNA pochodzącym z liści (29).

Istotną rolę w restrukturyzacji genomu poliploidalnego mogą odgrywać transpozony. Poliploidy posiadające więcej kopii poszczególnych genów lepiej tolerują niepożądane zmiany wywołane transpozycją prowadząc do większego zróżnicowania genomów. Ostatnio wykazano, że u *Gossypium* (bawełna) rozproszone sekwencje powtarzalnego DNA są charakterystyczne tylko dla diploidów posiadających genom A i brak ich w diploidach z genomem D. U allotetraploida (genom AD) stwierdzono przemieszczenie się powtarzalnych sekwencji z genomu A do D (30).

Przedstawione dane wskazują, że przy wszelkich zabiegach biotechnologicznych i hodowlanych mających na celu udoskonalenie roślin należy uwzględnić szereg cech genetycznych, w tym zmienność genomu dotyczącą zarówno cech funkcjonalnych jak i strukturalnych.

Literatura

1. Soltis D. E., Soltis P. S., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 42, 8089-8091.
2. Ramsey D., Schemske D. W., (1998), *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 29, 467-501.
3. Maluszyńska J., (1999), *Postępy Biologii Komórki*, 26 (11), 127-136.
4. Devos K. M., Gale M. D., (1997), *Plant Mol. Biol.*, 35, 3-15.
5. Maluszyńska J., (1999), *Postępy Biologii Komórki*, 26 (3), 507-522.
6. Ahn S., Anderson J. A., Sorrells M. E., Tanksley S. D., (1999), *Mol. Gen. Genet*, 241, 483-490.
7. Lagercrantz U., (1998), *Genetics*, 150, 1217-1228.
8. Olszewska M. J., Osiecka R., (1984), *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 174, 641-657.
9. Galbraith D. W., Harkins K. R., Knapp S., (1991), *Physiol. Plant.*, 96, 985-989.
10. Maluszyńska J., Schweizer D., (1999), *In vitro Plant*, 35, 168-169.
11. Mittelsten Scheid O., Jakovleva L., Afsar K., Maluszyńska J., Paszkowski J., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 7114-7119.
12. Sears E. R., (1976), *Annu. Rev. Genet.*, 10, 31-51.
13. Roberts M. A., Reader S. M., Dalgliesh C. Miller T. E., Foote T. N., Fish L. J., Snape J. W., Moore G., (1999), *Genetics*, 153, 1909-1918.
14. Martinez-Perez E., Show P. J., Moore G., (2000), *J. Cell Biol.*, 148, 233-238.
15. Feldman M., Liu B., Segal G., Abbo S., Levy A. A., Vega J. M., (1997), *Genetics*, 147, 1381-1387.
16. Maluszyńska J., (1995), *Biotechnologia*, 29, 92-100.
17. Bennett S. T., Kenton A. Y., Bennett M. D., (1992), *Chromosoma*, 101, 420-424.
18. Kenton A., Parokony A. S., Gleba Y. Y., Bennett M. D., (1993), *Mol. Gen. Genet.*, 240, 159-169.
19. Fukui K., Shishido R., Kinoshita T., (1997), *Theor. Appl. Genet.*, 95, 1239-1245.
20. Gatt M., Hammett K., Murray B., (1999), *Annals of Botany*, 84, 39-48.
21. D'Hont A. D., Paget-Goy A., Escoute J., Carreel F., (2000), *Theor. Appl. Genet.*, 100, 177-183.
22. Mikhailova E. I., Naranjo T., Shepherd K., Wennekes-von Eden J., Heyting C., de Jong H. J., (1998), *Chromosoma*, 107, 339-350.
23. Murata M., Heslop-Harrison J. S., Motoyoshi F., (1997), *Plant J.*, 12, 31-37.
24. Weiss H., Maluszyńska J., (2000), *Chromosome Research*, (w druku).
25. U N., (1935), *Jpn. J. Bot.*, 7, 389-453.
26. Maluszyńska J., Heslop-Harrison J. S., (1993), *Genome*, 36, 774-781.
27. Song K., Lu P., Tang K., Osborn T. C., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7719-7723.
28. Maluszyńska J., Hasterok R., Weiss H., (1998), *Plant Cytogenetics*, Ed. Maluszyńska J., 75-95, Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego, Katowice.
29. Hasterok R., Maluszyńska J., (2000), *Genome*, 43, 574-579.
30. Soltis D. E., Soltis P. S., (1999), *Tree*, 14, 348-352.