

ADAM J. LUKASZEWSKI

Department of Botany and Plant Sciences, University of California, Riverside, CA 92521, USA

Inżynieria chromosomowa w ulepszaniu roślin uprawnych

Chromosome engineering in improvement of crop plants

Inżynieria chromosomowa jest działaniem, mającym na celu wprowadzenie do rośliny uprawnej fragmentu chromatyny z pożądanym genem czy locus, bądź zmianę struktury chromosomów, podwyższającą wartość użytkową. Wytworzone konstrukty chromosomowe muszą kompensować nieobecność oryginalnego chromosomu; aby uniknąć wprowadzania cech sprzężonych introgresji z dzikich gatunków powinny obejmować minimalną ilość chromatyny. Techniki inżynierii chromosomowej obejmują losową fragmentację chromosomów i samoistne łączenie fragmentów w nowe układy, bądź wymuszoną rekombinację chromosomów. Fragmentacja produkuje znaczne liczby translokacji, ale większość z nich jest niekompensująca. Rekombinacja pozwala kontrolować pozycję i wielkość introgresji, ale często wymaga selekcji z olbrzymich populacji. Dobór metody powinien zależeć od celu zadania jak i dostępnych środków.

Słowa kluczowe: chromosom, crossing over, fragmentacja, introgresja, rekombinacja, translokacja

Chromosome engineering is an activity aiming at the introduction into crop plants of chromatin fragments with a desirable genes or loci, or changes in chromosome structure that increase crops' end value. New chromosome constructs must compensate the absence of original chromosomes; to minimize genetic drag, in introgressions from wild relatives the amounts of transferred chromatin should be kept at minimum. The available techniques include chromosome fragmentation followed by random fusion of fragments into chromosome structures, or induced recombination. The fragmentation approaches produce many translocations but a majority of them are non-compensating. Recombination offers a good measure of control of the location and size of the introgression but requires screening of large populations. The selection of the appropriate technique should be based on specific goals and the available resources.

Key words: chromosome, crossing over, fragmentation, introgression, recombination, translocation

WSTĘP

Chromosomy są nośnikami większości informacji genetycznej obecnej w komórkach organizmów wyższych. Z tego względu, jakiekolwiek doświadczenia genetyczne czy wysiłek hodowlany obejmują, *de facto*, manipulacje chromosomowe. W pewnych jednak sytuacjach, zwłaszcza, kiedy tworzy się mieszańce oddalone dla celów hodowlanych, konieczne są szczególne kroki, aby wymusić na chromosomach specyficzne zachowania,

bądź aby stworzyć nowe ich warianty czy formy. Takie świadome manipulacje chromosomami w celu ulepszenia roślin uprawnych zostały nazwane inżynierią chromosomową przez twórcę tej dziedziny, E. R. Sears'a (1981).

W ciągu kilku ostatnich dziesiętków lat hodowcy i genetycy roślin opracowali szeroki wachlarz technik i systemów manipulowania chromosomami, zarówno w celach badawczych jak i hodowlanych. Ten artykuł koncentruje się na technikach o bezpośrednim zastosowaniu w ulepszeniu roślin uprawnych; metody stosowane w badaniach naukowych, a bez praktycznego zastosowania w hodowli roślin, nie będą tutaj omawiane. Tym samym, głównym kryterium włączenia do niniejszego artykułu konkretnej techniki bądź systemu manipulowania chromosomami jest zastosowanie ich/jej wyników w praktycznej hodowli. Stosując takie kryterium jako punkt wyjściowy, można by sformułować następującą definicję inżynierii chromosomowej: **świadome działanie, mające na celu wprowadzenie z gatunku pokrewnego do uprawnego fragmentu chromatyny, który zawiera pożądaną gen czy locus, bądź taka zmiana struktury chromosomów w roślinie uprawnej, która podwyższa jej wartość użytkową.** W większości przypadków, inżynieria chromosomowa ma na celu przeniesienie do gatunków uprawnych, głównie z nieudomowionych gatunków pokrewnych, genów odporności na choroby, szkodniki, bądź niekorzystne warunki środowiska.

Ponieważ każda nowa odmiana musi przejść przez sito kryteriów rejestracji, oczywistym jest, że produktywność, szczególnie u roślin uprawianych na ziarno, nie może ucierpieć w wyniku manipulacji chromosomowych. W dyskusjach używa się argumentu, że jeżeli niekorzystny czynnik stresu biotycznego czy abiotycznego uniemożliwia uprawę danej rośliny, wprowadzenie odporności nawet przy wydatnie ograniczonej produktywności jest nadal korzystne. W rzeczywistości autorowi nie są znane szersze przypadki uprawy odmian o ograniczonej produktywności. Być może, dlatego że opłacalność uprawy takich odmian jest niska i rozsądniejszą alternatywą jest uprawa innego gatunku.

Wymóg normalnej produktywności linii introgresywnej wprowadza dwa ograniczenia zakresu manipulacji chromosomowych. Po pierwsze, wyprodukowany konstrukt chromosomowy musi być genetycznie ekwiwalentny do chromosomu, który ma zastąpić, czyli musi w pełni kompensować nieobecność oryginalnego chromosomu. Po drugie, ponieważ w większości przypadków dawcą pożądanego genu/locus jest dziki krewny, ilość chromatyny wprowadzanej do gatunku uprawnego wraz z pożądanym genem powinna być niewielka, aby uniknąć tzw. genetic drag, czyli wprowadzania sprzężonych cech z nieudomowionej puli genowej.

Nawet pobieżny przegląd literatury sugeruje, że w introgresjach międzygatunkowych i międzyrodzajowych istnieją poważne różnice pomiędzy gatunkami poliploidalnymi a diploidalnymi. Być może bardziej prawidłowe byłoby rozgraniczenie na gatunki autoploidalne, czyli posiadające kopie tego samego genomu, w tym i diploidy, oraz gatunki alloploidalne, czyli posiadające pary spokrewnionych, ale nieidentycznych genomów. Te różnice między auto- i alloploidami wynikają z oczywistego faktu, że wyłącznie koniugacja w biwalenty zapewnia regularną mejozę, czyli wysoką skuteczność produkcji genetycznie sprawnych gamet. Koniugacja w inne konfiguracje zawsze oznacza pewien

stopień niestabilności. Z tej obserwacji wynika, że w diploidach sprawniejsze formowanie biwalentów jest możliwe wtedy, kiedy kryteria doboru partnerów do koniugacji są luźne. Luźne kryteria pozwalają ignorować pewne różnice spokrewnionych, ale nieidentycznych chromosomów. Należy oczekiwać, przeto że jeżeli kryteria koniugacji są luźne, koniugacja homeologów jest dopuszczalna. Ponieważ koniugacja prowadzi do rekombinacji (crossing over), introgresja pożądaných genów/*loci* nie powinna nastręczać większych kłopotów. Ciekawym przypadkiem ilustrującym tego typu zachowanie chromosomów są mieszańce oddalone traw z rodzajów *Lolium* i *Festuca*, gdzie homeologi koniugują i rekombinują ze sobą z niesłychaną wprost częstotliwością (Zwierzykowski i in., 1999). Dzieje się tak pomimo olbrzymich różnic chromosomów na poziomie DNA: są one tak duże, że pozwalają na rozróżnianie pochodzenia fragmentów genomu za pomocą prostych technik hybrydyzacji *in situ* genomowego DNA. Sądząc z częstości introgresji, rekombinacja homeologów w mieszańcach oddalonych ryżu (Jena i in., 1992), pomidorów (Chetelat i Meglic, 2000), ziemniaków (Guzowska-Zimnoch, 2001), i wielu innych diploidów również musi być częsta. W hodowli diploidalnych roślin uprawnych rutynowo stosuje się krzyżowania oddalone i wyprowadza linie introgresywne bez straty nawet chwili na wymyślne techniki manipulowania chromosomami. Nie są one konieczne.

W gatunkach allopoloidalnych sytuacja jest diametralnie różna. Te gatunki są skonstruowane z więcej niż dwóch zestawów chromosomów (genomów) i zazwyczaj te genomy są blisko spokrewnione. Tym samym, bez specjalnej kontroli spokrewnione chromosomy miałyby tendencje do koniugacji w konfiguracje obejmujące więcej niż pary (czyli w multiwalenty), co wydatnie obniżałoby regularność mejozy. Ten problem wyraźnie ilustrują doświadczenia z nowo wyprodukowanymi amfiploidami, jak pszenżyto, które są niestabilne mejotycznie i tym samym mają niską płodność. W sytuacji, kiedy w jądrze obecne są więcej niż dwa zestawy spokrewnionych chromosomów, korzystnym z punktu widzenia sprawności mejozy jest wprowadzenie sztywnych kryteriów doboru partnerów do koniugacji. Tylko restryktywne kryteria homologii zapewniają koniugację w biwalenty i wykluczają koniugację homeologiczną. Doskonałym przykładem restrykcyjnych kryteriów homologii jest pszenica, allopoloid złożony z trzech par blisko spokrewnionych genomów, A, B i D. Poza niewielkimi różnicami strukturalnymi, te genomy są praktycznie identyczne z punktu widzenia genetycznego (Gale i in., 1993), choć fizyczne różnice w budowie chromosomów są ewidentne. Genomy A, B i D w pszenicy nie są w stanie ze sobą koniugować, bo nie dopuszcza do tego system genetyczny *Ph*, z którego główny gen *Ph1* jest ulokowany na chromosomie 5B (Riley i Chapman, 1958; Sears i Okamoto, 1958). System *Ph1* pszenicy jest tak restrykcyjny, że często koniugacja *bona fide* homologów (w mieszańcach międzyodmianowych) jest utrudniona, bądź niemożliwa (Dvorak i McGuire, 1981). Przy tak restrykcyjnych kryteriach koniugacji praktycznie nie ma możliwości koniugacji homeologicznej i introgresji międzygatunkowej czy międzyrodzajowej wymagają skomplikowanych operacji. W zasadzie wyklucza to możliwość wykonania takich introgresji w rutynowy sposób bezpośrednio w programie hodowlanym.

Pszenica nie jest jedynym allopoloidem z restrykcyjnym systemem kontroli koniugacji chromosomów. Oznaki obecności podobnych systemów zaobserwowano w *Festuca*

arundinacea (Jauhar, 1993) i w alloploidach rodzaju *Agropyron* (M. Feldman, informacja ustna). Można bezpiecznie zakładać, że większość, jeżeli nie wszystkie, alloplidy z biwalentną koniugacją chromosomów w MI meiozy posiadają diploidyżujące systemy genetyczne podobne do systemu *Ph* w pszenicy, które rozpoznają stopień podobieństwa chromosomów i wykluczają koniugację homeologów (Dubcovsky i in., 1995; Luo i in., 1996).

METODY INŻYNIERII CHROMOSOMOWEJ

Zakres technik manipulowania chromosomami jest niezwykle bogaty, ale można je zgrupować w dwie kategorie: metody polegające na fragmentacji chromosomów oraz metody polegające na indukowanej rekombinacji. Każda kategoria ma zalety i wady.

Fragmentacja chromosomów polega na losowym rozrywaniu i losowym łączeniu powstałych fragmentów w nowe kombinacje (translokacje). Rozrywanie może odbywać się poprzez mechanizmy genetyczne bądź fizyczne. Wśród mechanizmów genetycznych, Masoud-Nejad i wsp. (2002) wykorzystali tzw. gametocidal chromosomes, chromosomy obcych gatunków, których obecność w pszenicy powoduje losowe cięcia chromatyny, w manipulacjach żytniego ramienia 1RS. Nieco mniej losowym sposobem byłoby wykorzystanie inwersji dla inicjacji tzw. breakage-fusion-bridge cycles w konkretnych ramionach chromosomów, ale ta metoda nie była jeszcze próbowana w celach hodowlanych. Wśród mechanizmów fizycznych najczęściej stosowane jest napromieniowanie albo całych roślin, albo ich części, co powoduje rozrywanie włókien chromatyny. Łączenie rozerwanych fragmentów jest samoistne i nie wymaga specjalnych wysiłków.

Inżynieria chromosomowa oparta na fragmentacji ma szereg zalet: nie wymaga pokrewieństwa chromosomów, specjalnych materiałów czy linii, doświadczenia bądź wiedzy o gatunku i wymaga stosunkowo niewielkich nakładów pracy. Jej zasadniczą wadą jest losowość. Biorąc pod uwagę olbrzymie ilości DNA w jądrach i tym samym, astronomiczną liczbę możliwych punktów zerwania chromosomów, nawet jeżeli nie są one rozmieszczone zupełnie losowo (Künzel i in., 2001) i jeszcze większą liczbę możliwych kombinacji łączenia zerwanych fragmentów, prawdopodobieństwo stworzenia kompensującej translokacji przez losową fragmentację jest znikome. Tym samym, losowe translokacje różnią się wyłącznie stopniem braku kompensacji. Niemniej, może się zdarzyć, że konstrukt chromosomowy wyprodukowany przez metody losowe nadaje się do wykorzystania w rolnictwie, jak zdarzyło się z introgresją z *Aegilops umbellulata* (Sears, 1956).

Skuteczność zastosowania metod fragmentacji może być różna w zależności o poziomu ploidalności manipulowanego gatunku. W diploidach, selekcja gametyczna automatycznie usuwa niekompensujące konstrukty chromosomowe. Tym samym istnieje dobra gwarancja, że translokacje przekazane do następnych pokoleń (generatywnych) spełniają przynajmniej minimalne wymogi genetyczne. Dla odmiany w poliploidach, pokusa korzystania z fragmentacji jest większa ze względu na niższe prawdopodobieństwo crossing over, a kompensacja dodatkowych gnomów pozwala na przeżycie niekompensującym translokacjom. Skutek jest taki, że pszenica, alloplid z bardzo

restryktywnym system kontroli koniugacji chromosomów, ma niekwestionowany rekord świata w liczbie publikacji naukowych poświęconych translokacjom, które aczkolwiek wyprowadzone do celów czysto praktycznych, są zupełnie bezużyteczne z praktycznego punktu widzenia (patrz Friebe i in., 1996).

Indukowana rekombinacja homoeologiczna jest podstawowym aspektem systemu inżynierii chromosomowej opracowanego przez E. R. Sears'a (1981). Jej wykorzystanie zależne jest od spełnienia kilku podstawowych wymogów: manipulowane chromosomy, tzn. dawca pożądanego cechy/*locus* oraz jej odbiorca muszą być wystarczająco blisko spokrewnieni, aby koniugować w mejozie, nawet jeżeli w minimalnym tylko stopniu; dawca i odbiorca nie mogą zasadniczo różnić się strukturalnie ponieważ może to uniemożliwić inicjację koniugacji (Curtis i in., 1991; Kasha i Burnham, 1965; Nasuda i in., 1998) oraz niezbędne są specjalne linie/materiały, pozwalające na indukcję rekombinacji. Zaletą inżynierii chromosomowej opartej na rekombinacji jest możliwość precyzyjnego kontrolowania miejsca i rozmiaru introgresji. Ponieważ manipulacja oparta jest na rekombinacji, a ta z kolei możliwa jest wyłącznie, kiedy spełnione są pewne minimalne wymagania podobieństwa na poziomie DNA (Shen i Huang, 1986), pożądaný *locus* z całą pewnością znajdzie się we właściwym sobie miejscu w genomie, a nowy konstrukt chromosomowy będzie kompensujący. Za wadę mogą być uznane spore nakłady pracy, jakich to podejście wymaga.

W dwustopniowym systemie E. R. Sears'a (1981) opracowanym dla pszenicy, chromosom-dawca pożądanego *locus* jest wprowadzony do genomu pszenicy i zmuszany do koniugacji z wybranym odbiorcą-chromosomem pszenicy. Praktycznie, to zmuszanie odbywa się przez usunięcie bądź przez supresję genu *Ph1*, głównego genu w pszenicy odpowiedzialnego za restryktywną koniugację chromosomów. Pod nieobecność *Ph1* koniugacja homoeologiczna jest dopuszczalna i może być bardzo częsta, choć nawet w obrębie jednego potencjalnego dawcy pożądaných genów, jak żyto, potrafi być bardzo różna dla różnych ramion chromosomów (Naranjo i Fernandez-Rueda, 1996) i tylko część z tych różnic ma podłoże strukturalne (Devos i in., 1993). Wśród potomstwa odselekcjonowane są zrekombinowane chromosomy. Selekcja może być cytologiczna, bądź poprzez markery genetyczne w znanych pozycjach na chromosomach dawcy i odbiorcy, czy przez wykorzystanie markerów DNA, czy też różne kombinacje tych metod.

Z niejasnych powodów rekombinacja homeologiczna w pszenicy ograniczona jest prawie wyłącznie do pojedynczych wymian (cross overs) na ramię (Lukaszewski, 1995). Z tego powodu, zrekombinowane chromosomy w zdecydowanej większości są jednopunktowymi translokacjami, w jednej z dwóch możliwych konfiguracji: pszeniczne chromosomy z terminalnym segmentem z chromosomu dawcy i chromosomy dawcy z terminalnym segmentem z pszenicznego chromosomu-odbiorcy. Te chromosomy są zwane rekombinantami pierwotnymi (pierwszego rzędu) (Lukaszewski, 2000). Są one testowane na obecność pożądanego *locus* oraz mapowane genetycznie dla określenia pozycji punktu wymiany w stosunku do pożądanego *locus*. Mapowanie może odbywać się na kilka sposobów: taniem, choć mało precyzyjnym podejściem jest obserwacja częstości koniugacji z testerami; drogim, ale szybkim i precyzyjnym jest wykorzystanie markerów

DNA. Z każdej z dwóch konfiguracji rekombinantów pierwotnych wybrany jest taki rekombinant, który posiada pożądaną *locus* oraz ma najbliższy mu punkt translokacyjny.

W drugim etapie dwustopniowego systemu E. R. Sears'a, wyselekcjonowane dwa rekombinanty pierwotne są wprowadzane do jednej rośliny, która teraz ma normalny poziom kontroli koniugacji (praktycznie, ma normalny gen *Ph1*). Obecność *Ph1* dopuszcza wyłącznie koniugację homologiczną. Jedynym odcinkiem homologii wspólnym dla obydwu rekombinantów pierwotnych jest odcinek chromosomu dawcy pomiędzy punktami translokacyjnymi. Wymiana (crossing over) w tym odcinku homologii daje chromosom pszenicy z interkalarną wstawką obcej chromatyny, która zawiera pożądaną *locus* oraz normalny (i nieprzydany) chromosom dawcy.

Precyzja tego typu manipulacji, czyli wielkość odcinka chromosomu dawcy wprowadzonego do chromosomu pszenicy, zależy od dwóch czynników: od wielkości populacji rekombinantów pierwotnych i od precyzji mapowania punktów translokacyjnych w tych rekombinantach. Z kolei wielkość populacji rekombinantów pierwotnych jest prostą funkcją wielkości analizowanej populacji wyjściowej oraz skuteczności selekcji. Jeżeli znana jest częstość koniugacji chromosomu-dawcy i odbiorcy, wielkość wyjściowej populacji, z której będą selekcjonowane rekombinanty pierwotne, niezbędnej dla osiągnięcia zadowalającym prawdopodobieństwem pożądanej precyzji, oblicza się według następującego wzoru:

$$n = \frac{\log(1 - 0,95)}{\log(1 - P)}$$

gdzie:

n = wielkość próby

P = częstość zdarzenia, tutaj prawdopodobieństwo rekombinacji.

Z równania wynika, że jeżeli donor i odbiorca koniugują z częstotliwością 1%, oraz oczekuje się, że produkt ostateczny będzie zawierał nie więcej niż 1 cM obcej chromatyny wokół przenoszonego *locus*, konieczne jest preselekcjonowanie populacji 29800 osobników dla 95% prawdopodobieństwa uzyskania dwóch właściwych punktów wymiany w rekombinantach pierwotnych, koniecznych dla osiągnięcia celu. Jeżeli źródłem pożądanego *locus* jest dziki krewny gatunku uprawnego, cel 1 cM wokół pożądanego *locus* nie wydaje się ekstrawagancki, a 1% koniugacji dla obcych chromosomów w pszenicy nie jest niski (patrz Naranjo i Fernandez-Ruead, 1996). Oznacza to, że w większości przypadków inżynierii chromosomowej opartej na indukowanej koniugacji homeologicznej, trzeba się liczyć z koniecznością selekcji w dużych populacjach wyjściowych.

W praktycznym zastosowaniu dwustopniowej metody E. R. Sers'a, Lukaszewski (2000) podjął próbę manipulacji żytniego ramienia chromosomu 1RS. W translokacji 1RS.1BL to ramię wprowadza do pszenicy żytnie geny odporności na choroby *Pm8*, *Sr31*, *Lr26* i *Yr9*, pozytywnie wpływa na plon (najprawdopodobniej przez zwiększanie masy korzeni, J. G. Waines, inf. ustna), ale wydatnie obniża wartość wypiekową. Selekcja z populacji

wyjściowej liczącej 17006 osobników wyizolowała 103 rekombinanty pierwotne 1RS z 1BS (rekombinanty 1RS z 1AS i 1DS również były obecne, ale były nieprzydatne w tym kontekście). Mapowanie tych rekombinantów wykazało, że geny odpowiedzialne za jakość: *Gli-B1* i *Glu-B3* pszenicy oraz *Sec-1* żyta są ulokowane w niekorespondujących sobie miejscach chromosomów (odpowiednio 1BS i 1RS) i dla dalszej komplikacji, są rozdzielone segmentem zawierającym wszystkie istotne geny odporności. To wymusiło wyprodukowanie nie tylko rekombinantów wtórnych (z pojedynczymi interkalarnymi wstawkami pszenicy w ramieniu żyta), ale również rekombinantów trzeciego rzędu. Te rekombinanty są żytnimi ramionami 1RS z dwiema wstawkami z 1BS pszenicy: wstawka dystalna wprowadza *Gli-B1* i *Glu-B3*; wstawka proksymalna usuwa segment 1RS z *locus Sec-1*. Uzyskanie rekombinantów wtórnych wymagało selekcji spośród 6099 osobników; uzyskanie rekombinantów trzeciego stopnia wymagało selekcji spośród 1043 osobników. Łącznie całe przedsięwzięcie wymagało analizy 24743 roślin. Ta populacja była znacznie mniejsza niż wskazana przez równanie podane powyżej, czyli do pewnego stopnia operacja polegała na szczęściu. Dodatkowo, w proces produkcji rekombinantów wtórnych wkomponowane było mapowanie genetyczne znacznej grupy rekombinantów pierwotnych, co oszczędziło sporo czasu i funduszy.

Powyższe rozważania sugerują jednoznacznie, że duże populacje wyjściowe gwarantują większą liczbę rekombinantów pierwotnych, a tym samym, wyższą precyzję inżynierii chromosomowej. Z drugiej strony, duże liczby rekombinantów pierwotnych komplikują proces mapowania punktów wymian: mapowanie staje się trudniejsze i droższe, bo uzyskanie rozdzielczości rzędu 0,5 cM zazwyczaj wymaga zastosowania kilku systemów markerów. Autor podejrzewa, że w pewnym punkcie dalsze podwyższanie rozdzielczości mapowania może okazać się nieopłacalne i ten punkt będzie wyznaczał rozsądną wielkość populacji rekombinantów pierwotnych, a tym samym wielkość populacji wyjściowej.

Kolejnym czynnikiem ograniczającym wielkość populacji rekombinantów pierwotnych jest zależność pomiędzy strukturą chromosomów, a ich zdolnością do koniugacji. Nawet identyczne długie odcinki chromosomów nie są zdolne do koniugacji, jeżeli zawierające je chromosomy różnią się od siebie strukturalnie w okolicach telomeru (Lukaszewski, 1997). Ponieważ dwa rekombinanty pierwotne, wyselekcjonowane do drugiego etapu manipulacji, mają przeciwstawną strukturę w okolicach telomeru (jeden ma tam segment pszenicy, a drugi dzikiego dawcy), ich zdolność rekombinacji we wspólnym segmencie homologii jest zawsze poważnie ograniczona. Łatwo sobie wyobrazić sytuację, kiedy segment homologii wspólny dla dwóch wybranych rekombinantów jest tak niewielki, że albo nie będzie w ogóle rozpoznany jako homologiczny, bądź będzie zbyt krótki na utworzenie chiasmy. Tym samym, otrzymanie rekombinantów wtórnych będzie niemożliwe.

Pytaniem, na które jak dotąd nie ma odpowiedzi opartej na wystarczającej liczbie obserwacji jest kwestia, czy wysoka precyzja inżynierii chromosomowej jest rzeczywiście niezbędna. Często powtarzanym dogmatem jest twierdzenie, że introgresje z nieudomowionej puli genowej wiążą się z ogólnym spadkiem stopnia adaptacji materiałów hodowlanych i wprowadzają wiele cech gatunków dzikich. Wiele obserwacji

wyduje się to potwierdzać (Duvick, 1990). Z drugiej strony, znane są przypadki ilustrujące nieoczekiwane pozytywne efekty takich introgresji. W pszenicy, introgresja segmentu chromosomu z *Agropyron elongatum*, stworzona dla wprowadzenia genu *Lr19*, odporności na rdze liściową, również wprowadziła bardzo niekorzystny gen *Yp*, żółtego zabarwienia mąki, ale i wysoce pozytywny czynnik zwyczajki plonu (Singh i in., 1998). Wspomniana powyżej introgresja żytniego ramienia 1RS do pszenicy nie tylko wprowadziła szereg genów odporności na choroby i szkodniki, ale również podniosła plon, jednocześnie obniżając wartość wypiekową. Introgresja segmentu chromatyny z genem *Lr47* z *Aegilops speltoides* do pszenicy wydaje się zwiększać sztywność słomy w pszenicy heksaploidalnej (Dubcovsky, inf. ustna), ale w pszenicy *durum* zmniejsza kłos do karykaturalnych rozmiarów. Te przykłady wskazują, że tzw. genetic drag wywołuje skutki nie tylko negatywne, oraz że mogą one być bardzo różne w zależności od tła genetycznego.

Poza częstością rekombinacji chromosomu-dawcy i odbiorcy, oraz rozdzielczości wybranej metody mapowania pozycji punktów translokacyjnych w stosunku do przenoszonego locus, w planowaniu intregresji międzygatunkowych i międzyrodzajowych warto rozważyć kilka dodatkowych czynników. Wśród nich ważne są: stopień pokrewieństwa i różnice strukturalne dawcy i odbiorcy, rozmieszczenie rekombinacji homeologicznej w stosunku do lokalizacji przenoszonego genu, różnice pomiędzy fizycznym a genetycznym rozmieszczeniem rekombinacji, tzw. wierność (fidelity) rekombinacji homoeologicznej (czyli skłonność chromosomu dawcy do rekombinowania z wybranym chromosomem-odbiorcą, a nie innymi homeologami) oraz możliwości manipulowania rozmieszczeniem rekombinacji. Każdy z tych czynników może mieć zasadniczy wpływ na powodzenie lub niepowodzenie podjętego zadania. Szczegółowe omawianie ich w tym miejscu znacznie przekroczyłoby dopuszczalne rozmiary artykułu, tym bardziej, że żaden z tych problemów nie został rozpracowany w szczegółach pozwalających na daleko sięgające uogólnienia.

Poza introgresjami z mieszańców oddalonych, ciekawym aspektem inżynierii chromosomowej jest możliwość kontrolowanego podwajania konkretnych części genomu. System ten jest dobrze opracowany w jęczmieniu; duplikacje produkuje się przez przekrzyżowania linii posiadających różne translokacje tych samych par chromosomów i selekcję wśród potomstwa (Hagber i Hagberg, 1991). Niektóre z takich duplikacji spowodowały bardzo wysokie zwyczajki plonów we wstępnych testach (Hagber i Hagberg, 1991). Niestety, należy wątpić, aby tego typu manipulacje zostały wypróbowane w innych roślinach uprawnych. Poza kukurydzą chyba żadna z nich nie posiada zestawów translokacji, które mogłyby służyć takim celom, a spadek zainteresowania cytogenetyką nie wróży nadziei na szybkie wyprodukowanie podobnych zestawów.

PODSUMOWANIE

Warto podkreślić zasadniczą różnicę w zachowaniu homeologów pomiędzy diploidami i poliploidami. To, co w gatunku alloploidalnym wymaga skomplikowanych manipulacji kilkoma chromosomami jednocześnie, w gatunku autoploidalnym może być prostym zadaniem hodowlanym, sprowadzającym się do wykonania krzyżowań i przeprowadzenia

ostrej selekcji wśród wielkiej populacji potomstwa. Tam, gdzie koniugacja homoeologiczna może być wykorzystana, pozwala ona na precyzyjne przenoszenie fragmentów chromatyny z gatunku do gatunku i gwarantuje wysokie prawdopodobieństwo powodzenia, ale wymaga dużych nakładów pracy. Metody oparte na fragmentacji chromosomów są loterią, ale mogą być jedynym wyjściem w sytuacjach, w których homeologi odmawiają koniugacji, co wyklucza rekombinację przez crossing over.

Ostatecznie warto pamiętać, że w prawie każdej sytuacji, próby wprowadzenia nowego *locus* do gatunku, mimo że mogą podlegać pewnym generalnym zasadom inżynierii chromosomowej, zawsze wiążą się z wieloma niewiadomymi. Trudno jest przewidzieć wszystkie możliwe zachowania mieszańców i ich chromosomów, więc warto przygotować się na sporo improwizacji. Sztywne schematyczne podejście do problemu zazwyczaj nie wróży wysokiej szansy powodzenia.

LITERATURA

- Chetelat R. T., Meglic V. 2000. Molecular mapping of chromosome segments introgressed from *Solanum lycopersicoides* into cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*). Theor. Appl. Genet. 100: 323 — 241.
- Curtis C. A., Lukaszewski A. J., Chrzastek M. 1991. Metaphase I pairing of deficient chromosomes and genetic mapping of deficiency breakpoints in common wheat. Genome 34: 553 — 560.
- Devos K. M., Atkinson M. D., Chinoy C. N., Francis H. A., Harcourt R. L., Koebner R. M. D., Liu, C. J., Masojc P., Xie D. X., Gale M. D. 1993. Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. Theor. Appl. Genet. 85: 673 — 680.
- Dubcovsky J., Luo M. C., Dvorak J. 1995. Differentiation between homoeologous chromosomes 1A of wheat and 1A^m of *Triticum monococcum* and its recognition by the *Ph1* locus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6645 — 6649.
- Duvick D. N. 1990. The romance of plant breeding and other myths. In: Gene manipulation in plant improvement. J. P. Gustafson (ed.), Plenum Press, New York: 39 — 54.
- Dvorak, J., McGuire P. E. 1981. Nonstructural chromosome differentiation among wheat cultivars, with special reference to differentiation of chromosomes in related species. Genetics 97: 391 — 414.
- Friebe B., Jiang J., Raupp W. J., McIntosh R. A., Gill B. S. 1996. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. Euphytica 91: 59 — 87.
- Gale M. D., Atkinson M. D., Chinoy C. N., Harcourt R. L., Jia J., Li Q. Y., Devos K. M. 1993. Genetic maps of hexaploid wheat. Proc. 8th Int. Wheat Genet. Symp. Li Z.S., and Xin Z. Y., (eds.) Beijing, China: 29 — 40.
- Guzowska-Zimnoch E. 2001. Diploidalne mieszańce międzygatunkowe ziemniaka jako źródło odporności na mokrą zgniliznę bulw i czarną nóżkę w hodowli ziemniaka. Monografie i Rozprawy Naukowe IHAR, Radzików, 8/2001.
- Hagberg A., Hagberg P. 1991. Production and analysis of chromosome duplications in barley. In: Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution. Gupta, P. K., Tsuchiya T. (eds.) Elsevier, Amsterdam: 401 — 410.
- Jauhar P. P. 1993. Cytogenetics of the *Festuca-Lolium* complex. Relevance to breeding. SpringerVerlag, Berlin.
- Jena K. K., Kush G. S., Kochert G. 1992. RFLP analysis of rice (*Oryza sativa* L.) introgression lines. Theor. Appl. Genet. 84: 608 — 616.
- Kasha R. J., Burnham C. R. 1965. Location of interchange breakpoints in barley. II. Chromosome pairing and the intercross method. Can. J. Genet. Cytol. 7: 620 — 632.
- Künzel G., Gecheff K. I., Schubert I. 2001. Different chromosomal distribution patterns of radiation-induced interchange breakpoints in barley: first post-treatment mitosis versus viable offspring. Genome 44: 128 — 132.

- Lukaszewski A. J. 1995. Physical distribution of translocation breakpoints in homoeologous recombinants induced by the absence of the *Ph1* gene in wheat and triticale. *Theor. Appl. Genet.* 90: 714 — 719.
- Lukaszewski A. J. 1997. The development and meiotic behavior of asymmetrical isochromosomes in wheat. *Genetics* 145: 1155 — 1160.
- Lukaszewski A. J. 2000. Manipulation of the 1RS.1BL translocation in wheat by induced homoeologous recombination. *Crop Sci.* 40: 216 — 225.
- Luo M.-C., Dubcovsky J., Dvorak J. 1996. Recognition of homoeology by the wheat *Ph1* locus. *Genetics*. 144: 1195 — 1203.
- Masoud-Nejad, A., Nasuda S., McIntosh R. A., Endo T. R. 2002. Transfer of rye chromosome segments to wheat by a gametocidal system. *Chromosome Res.* 10: 349 — 357.
- Naranjo T., Fernandez-Rueda P. 1996. Pairing and recombination between individual chromosomes of wheat and rye in hybrids carrying the *ph1b* mutation. *Theor. Appl. Genet.* 93: 242 — 248.
- Nasuda S., Friebe B., Busch W., Kynast R. G., Gill B. S. 1998. Structural rearrangement in chromosome 2M of *Aegilops comosa* has prevented the utilization of the compare and related wheat-*A. comosa* translocations in wheat improvement. *Theor. Appl. Genet.* 96: 780785
- Riley R., Chapman V. 1958. Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. *Nature (London)* 182: 713 — 715.
- Sears E. R. 1956. The transfer of leaf rust resistance from *Ae. umbellulata* to wheat. *Brookhaven Symp. Biol.* 9: 1 — 22.
- Sears E. R. 1981. Transfer of alien genetic material to wheat. In: *Wheat science: today and tomorrow*. Evans, L. T., W. J. Peacock (Eds.), Cambridge Univ. Press, Cambridge: 75 — 89.
- Sears E. R., Okamoto M. 1958. Intergenomic chromosome relationships in hexaploid wheat. *Proc. 10th Int. Congr. Genet.*: 258 — 259.
- Shen P., Huang H. V. 1986. Homologous recombination in *Escherichia coli*: dependence on substrate length and homology. *Genetics* 112: 441 — 457.
- Singh R. P., Huerta-Espino J., Rajaram S., Crossa J. 1998. Agronomic effects from chromosome translocations 7DL.7Ag and 1BL.1RS in spring wheat. *Crop Sci.* 38: 27 — 33.
- Zwierzykowski Z., Lukaszewski A. J., Naganowska B., Lesniewska A. 1999. The pattern of homoeologous recombination in triploid hybrids of *Lolium multiflorum* with *Festuca pratensis*. *Genome* 42: 720 — 726.

PODZIEKOWANIA

Autor dziękuje Prof. dr. Zygmuntowi Kaczmarkowi z Instytutu Genetyki Roślin PAN za wzór obliczania wielkości próby.