

TERESA ORLIKOWSKA
KATARZYNA WIEJACHA
AGNIESZKA MARASEK

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, Skierniewice

Identyfikacja roślinnych mieszańców oddalonych — przegląd metod*

Identification of plant distant hybrids — methods review

Krzyżowanie międzygatunkowe i międzyrodzajowe jest ważną metodą we współczesnej hodowli. Celem tego krzyżowania jest najczęściej włączenie genów z form nieuprawnych do materiału hodowlanego, warunkujących lepszą zdolność przystosowawczą do niesprzyjających warunków uprawy i odporność na czynniki patogeniczne. W wyniku krzyżowania oddalonego mogą zaistnieć warunki do powstawania zarodków apomiktycznych oraz do eliminacji całego lub części genomu jednego, albo obojga partnerów. Dlatego jest ważne, aby jak najwcześniej zweryfikować status genetyczny powstających siewek lub zregenerowanych roślin. Weryfikację można prowadzić wykorzystując uprzednio opracowane markery. W tej pracy omówiono metody testowania mieszańców oddalonych na podstawie markerów morfologicznych, cytologicznych i molekularnych.

Słowa kluczowe: identyfikacja, markery cytologiczne, markery molekularne, markery morfologiczne, mieszańce oddalone

Interspecific and intergeneric hybridization is a method of high importance in modern plant breeding. The goal of distant hybridization is introduction of genes to breeding materials from wild species, which code for resistance to non-favourable agricultural conditions and to pathogenic factors. In course of distant hybridization conditions may occur for formation of apomictic embryos, as well as for elimination of the whole genome of one partner or a part of chromosomes of one or both partners. For this reason, it is important to verify genetic status of arising seedlings or regenerants as early as possible. Such verification can be performed using markers established earlier by means of diverse methods. In this paper several methods of verification are discussed based on morphological, cytological and molecular markers.

Key words: identification, cytological markers, molecular markers, morphological markers, distant hybrids

* Praca została wykonana w ramach projektu badawczego KBN 756/P06/98/14

WPROWADZENIE

Krzyżowanie roślin jest podstawową metodą w tworzeniu nowych odmian. Lepsze poznanie i możliwość kontrolowania biologii zapylania i zapłodnienia znacznie zwiększyły skuteczność krzyżowania generatywnego odległych taksonów. Dzięki tej wiedzy można w znacznym stopniu ingerować w proces zapłodnienia i omijać naturalne bariery niezgodności przez usuwanie znamienia lub skracanie słupka, nanoszenie pyłku na kanał słupka lub bezpośrednio do zalążni, inaktywację enzymów znamienia w wysokiej temperaturze, aplikację regulatorów wzrostu (auksyny, gibereliny lub cytokininy) na znamię lub zalążnię, wreszcie przez umożliwienie rozwoju wyizolowanego zarodka w warunkach *in vitro* (Zenkeler, 2001). Inną metodą omijania barier krzyżowania jest łączenie protoplastów (komórek wegetatywnych albo generatywnych pozbawionych ścian) lub fragmentów komórek w warunkach *in vitro*. W ten sposób można otrzymać mieszańce somatyczne lub gametosomatyczne.

Krzyżowanie współczesnych odmian z formami dziko rosnącymi tego samego lub pokrewnego gatunku jest ważną metodą, dzięki której można otrzymać materiał hodowlany posiadający geny związane z odpornością na patogeny i niesprzyjające warunki uprawy. Geny te, obecne w gatunkach nie udomowionych, które w wielu przypadkach wchodziły w skład mieszańców pierwotnych — przodków dzisiejszych odmian, zostały wyeliminowane w drodze dotychczasowej jednostronnej selekcji, ukierunkowanej na wydajność poszczególnych organów lub składników suchej masy oraz na jakość zewnętrzną. Literatura na temat krzyżowania oddalonego jest bogata. Została zebrana m.in. w opracowaniu książkowym Belea (1992). Obszerne opracowania w literaturze polskiej znajdują się m.in. w publikacjach Niemirowicz-Szczytt i Malepszego (1989) oraz Kucharskiej i Orlikowskiej (1997).

Nie wszystkie siewki lub pędy zregenerowane z kalusującego zarodka otrzymanego z krzyżowania są mieszańcami. Niektóre rodzaje i gatunki, np. *Lilium regale* (North i Wills, 1969), *Manihot esculentum* (Nassar i in., 1998), *Ribes* (Keep, 1975) są skłonne do apomiksji — rozwoju zarodka z matecznych komórek woreczka zalążkowego, szczególnie w wyniku zapylania pyłkiem niezgodnym lub niepłodnym. Możliwość wystąpienia apomiksji, niekontrolowanych zapyleń, które mogą zdarzyć się nawet przy stosowaniu bardzo restrykcyjnych procedur krzyżowania oraz powstawanie homokariocytów w wyniku fuzji protoplastów, powodują potrzebę potwierdzenia mieszańcowego charakteru pojedynków, przeznaczonych do dalszych prac hodowlanych. W wielu przypadkach mieszańcowy charakter siewek można rozpoznać dzięki markerom morfologicznym, ujawniającym się we wczesnym stadium rozwoju. Czasem jednak identyfikacja mieszańców jest możliwa dopiero na podstawie zachowania roślin ujawniającego się w reakcji na specyficzne warunki lub na podstawie cech kwiatów lub owoców. W przypadku roślin o długim okresie juvenilnym oznacza to kilkuletnią lub nawet wieloletnią bezowocną pielęgnację roślin, które nie są spodziewanymi mieszańcami. Ich identyfikację można prowadzić na podstawie cech markerowych form rodzicielskich, obserwowanych na różnych poziomach organizacyjnych roślin — morfologicznym, cytologicznym lub molekularnym. Zostaną one kolejno omówione w tym opracowaniu.

MARKERY MORFOLOGICZNE

Identyfikacja mieszańców na podstawie markerów morfologicznych to sposób najbardziej oczywisty i najłatwiejszy pod warunkiem, że cechy morfologiczne (np. kolor okrywy nasiennej, liścieni, kwiatu, kształt liści, pokrój i wysokość roślin, powierzchnia liści lub pędów) są wyraźnie zróżnicowane u krzyżowanych partnerów, co często występuje w grupach oddalonych systematycznie. Takiego zróżnicowania można spodziewać się nie tylko w odrębnych gatunkach lub rodzajach, ale także pomiędzy znacznie różniącymi się grupami odmian, np. pomiędzy liliami azjatyckimi i orientalnymi. Przekonującym dowodem na charakter mieszańcowy roślin z krzyżowania generatywnego jest przede wszystkim odziedziczenie cech charakterystycznych dla formy ojcowskiej albo wystąpienie ich w formie pośredniej. Markerami dla mieszańców somatycznych muszą być cechy obojga rodziców lub pośrednie. W tabeli 1 podano przykłady zastosowania morfologicznych cech markerowych, używanych do wyselekcjonowania mieszańców oddalonych generatywnych i somatycznych.

Tabela 1

Dziedziczenie cech morfologicznych w mieszańcach oddalonych
Inheritance of morphological traits in distant hybrids

Formy rodzicielskie Parental forms	Dziedziczenie cech markerowych Inheritance of marker traits			Autorzy Authors
	pośrednie intermediate	po matce maternal	po ojcu paternal	
1	2	3	4	5
<i>Acer griseum</i> × <i>A. maxi</i> <i>mowitchianum</i>	powierzchnia i kształt liści leaf shape and area	łuszczenie kory bark peeling off	szerokość i długość liści, przebarwienie jesienne liści leaf width and length autumn colour change	Joung i in. (2001)
<i>Aegilops</i> (3 species) × <i>Secale cereale</i>	morfologia roślin plant morphology		omszenie dokłosa neck pubescence	Wojciechowska (1996)
<i>Avena strigosa</i> × <i>A. magna</i>	kształt wiechy, kolor plewy panicle shape, lemma colour	liczba płodnych kwiatków w kłosku number of fertile flowers per spikelet	liczba kwiatków w kłosku number of flowers per spikelet	Ladizinsky (2000)
<i>Brassica carinata</i> × <i>Sinapis turgida</i>	morfologia liści, kwiatostanów i kwiatów, budowa epidermy morphology of leaves, inflorescences and flowers, structure of epidermis			Momotaz i in. (1998)
<i>Brassica oleracea</i> + <i>Camelina sativa</i>	szerokość liści leaf width			Hansen (1998)
<i>Brassica oleracea</i> + <i>Capsella bursa-pastoris</i>	morfologia rośliny i kwiatu plant and flower morphology			Sigareva i Earle (1999)
<i>Brassica oleracea</i> + <i>Armoracia rusticana</i>		morfologia kwiatostanu inflorescence morphology	morfologia ogonków liściowych petiole morphology	Navratilova i in. (1997)
<i>Cucurbita pepo</i> × <i>C. martinii</i>	morfologia liści i kwiatów leaf and flower morphology		odporność na mączniaka i CMV mildew and CMV mildew and CMV	Metwally i in. (1996)

c.d. Tabela 1

1	2	3	4	5
<i>Dianthus chinensis</i> + <i>D. barbatus</i>	barwa i wzór płatków kwiatowych color and pattern of petals	zdolność do regeneracji po <i>D. chinensis</i> regeneration capacity after <i>D. chinensis</i>		Nakano i Mii (1993 a)
<i>Erucastrum abyssinicum</i> × <i>Brassica oleracea</i>	morfologia liści leaf morphology		barwa kwiatów flower color	Sarmah i Sarla (1998)
<i>Glycine max</i> × <i>G. tomentella</i>	morfologia liści leaf morphology		płożący pokrój decumbent habit	Chung i Kim (1990)
<i>Helianthus annuus</i> + <i>H. maximiliani</i>	wysokość pędu, morfologia liści, wielkość kwiatostanu shoot length, leaf morphology, inflorescence size	kształt nasion, kształt kwiatów języczkowych po <i>H. annuus</i> seed shape, shape of ligular flowers after <i>H. annuus</i>	wieloletniość po <i>H. maximiliani</i> perennial character after <i>H. maximiliani</i>	Henn i in. (1998)
<i>Hordeum vulgare</i> + <i>Daucus carota</i>			morfologia rośliny po <i>Daucus carota</i> plant morphology after <i>Daucus carota</i>	Kisaka i in. (1998 a)
<i>Hydrangea macrophylla</i> × <i>H. arborescens</i>	morfologia pędu, budowa epidemy stem morphology, epidermal structure			Kudo i Niimi (1999)
<i>Impatiens hookeriana</i> × <i>I. campanulata</i>	wielkość roślin plant size	morfologia kwiatu flower morphology		Arisumi (1980)
<i>Lilium longiflorum</i> × <i>L. callosum</i>	wielkość kwiatów flower size		barwa płatków petal color	Roh i in. (1996a)
<i>Lilium nobilissimum</i> × <i>L. regale</i>	morfologia liści, termin wybijania pędów i zakwitania leaf morphology, term of shoot sprouting and flowering		morfologia ogonka liściowego, ustawienie horyzontalne kwiatu petiole morphology, horizontal flower attachment	Obata i in. (2000)
<i>Lilium lankongense</i> × <i>L. davidii</i>		pokrój pędu shoot habit	owłosienie brzegów liści hairy leaf margins	North i Wills (1969)
<i>Limonium sinuatum</i> × <i>L. perezii</i>	morfologia liści i kwiatów leaf and flower morphology	wysokość i pokrój rośliny plant habit and height	barwa okwiatu flower color	Morgan i in. (1998)
<i>Lycopersicon esculentum</i> + <i>Solanum tuberosum</i>	morfologia liścia, kwiatu i kwiatostanu leaf, flower and inflorescence morphology			Gavrilenko i in. (1992)
<i>Oryza sativa</i> + <i>Hordeum vulgare</i>		morfologia rośliny po <i>Oryza sativa</i> plant morphology after <i>Oryza sativa</i>	szerokość liści po <i>Hordeum vulgare</i> leaf width after <i>Hordeum vulgare</i>	Kisaka i in. (1998 b)
<i>Sorghum bicolor</i> × <i>Saccharum officinarum</i>	długość liści, liczba międzywęzli leaf length, no. of internodes	kształt języczka, długość międzywęzli, obecność korzeni powietrznych ligular shape, length of internodes, presence of aerial roots	ogólna morfologia general morphology	Nair (1999)
<i>Vigna unguiculata</i> × <i>V. vexillata</i>	kształt liści, kolor strąka i okrywy nasiennej leaf morphology, pod and seed coat colour		owłosienie pędów, liści i strąków stem, leaf and pod hairiness	Gomathina- yagam i in. (1998)

Szczególnym przypadkiem jest weryfikacja mieszańców na podstawie wysokiego potencjału regeneracyjnego roślin mieszańcowych, obserwowanego w warunkach *in vitro*. W rodzaju *Helianthus* jest on dziedziczony po dziko rosnących gatunkach, takich jak *H. mollis*, *H. giganteus*, *H. strumosus*, *H. decapetalus* (Weber i in., 2000). Mieszańce odmian uprawnych skrzyżowane z tymi gatunkami wytwarzały pędy o bardzo wysokiej zdolności do regeneracji zarówno pędów kątowych, jak i przybyszowych.

MARKERY CYTOLOGICZNE

Cechami markerowymi, obserwowanymi w preparatach mikroskopowych, mogą być: wielkość całego genomu, liczba, wielkość i morfologia chromosomów, zdolność do barwienia jąder ziaren pyłku, konfiguracje meiotyczne i hybrydyzacja DNA jądrowego z sondami specyficznych frakcji DNA lub DNA ogólnego.

Wielkość genomu, liczba i morfologia chromosomów mitotycznych

Podstawą identyfikacji mieszańców *Brassica napus* × *B. juncea* (Bajaj i wsp., 1986), *Aegilops* sp. ($2n = 28$) × *Secale cereale* ($2n = 14$) (Wojciechowska, 1996) oraz *Limonium perezii* ($2n = 14$) × *L. sinuatum* ($2n = 16$) (Morgan i wsp., 1998) była liczba chromosomów, oznaczona w merystemach wierzchołkowych korzeni. Było to możliwe, ponieważ formy rodzicielskie miały różne poziomy ploidalności lub różne liczby podstawowe chromosomów. Mieszańce generatywne F_1 powinny posiadać sumę chromosomów komórek gametycznych, natomiast mieszańce somatyczne sumę chromosomów występujących w protoplastach. Liczba chromosomów większa od spodziewanej w mieszańcach generatywnych jest rezultatem sporadycznie występującego braku redukcji liczby w gametach. Taki przypadek opisano dla krzyżowania *Lilium longiflorum* z *L. concolor* ($2n = 24$), gdzie otrzymano mieszańce diploidalne i triploidalne (Fernandez i in., 1996). Mieszaniec somatyczny *Hordeum vulgare* ($2n = 14$) + *Oryza sativa* ($2n = 12$) posiadał 26 chromosomów (Kisaka i in., 1998 b.), natomiast w wyniku połączenia komórek somatycznych *N. tabacum* ($2n = 4x = 48$) z gametami *N. glutinosa* ($n = x = 12$) otrzymano rośliny gametosomatyczne o 60 chromosomach (Giddings i Rees, 1992). Często jednak liczba chromosomów jest znacząco różna od spodziewanej. Dla przykładu, w komórkach mieszańca *Hydrangea macrophylla* ($2n = 52$) × *H. arborescens* ($2n = 38$) stwierdzono $2n = 42$ chromosomy (Kudo i Niimi, 1999). W tym przypadku aneuploidalność mogła być spowodowana destabilizacją kalusa (otrzymanego z wyizolowanego zarodka), z którego mieszaniec został zregenerowany. Eliminacja chromosomów w kolejnych podziałach komórek powstałych z fuzji protoplastów roślin odległych filogenetycznie jest zjawiskiem częstym, związanym ze zróżnicowaną długością cyklu komórkowego lub/i brakiem powinowactwa do wrzeciona podziałowego (Rogalska, 1999). W wielu przypadkach u mieszańców somatycznych stwierdzano mniej chromosomów niż wynosi suma chromosomów partnerskich. Dla przykładu, mieszaniec powstały z połączenia protoplastów komórek somatycznych *Dianthus chinensis* ($2n = 30$) + *D. barbatus* ($2n = 30$) posiadał $2n = 52$ chromosomy (Nakano i Mii, 1993 a). Mieszańce *Medicago truncatula* ($2n = 16$) + *M. scutellata* ($2n = 30$) miały liczbę chromosomów $2n = 16$ lub $2n = 26$, a ich fenotyp przypominał *M. truncatula* (Tian i Rose, 1999). Całkowita eliminacja chromosomów jednego z partnerów, prowadząca do otrzymania czystych haploidów jednej z form rodzicielskich, może

być spowodowana genetycznymi właściwościami i najlepiej została poznana w krzyżowaniach z *Hordeum bulbosum* (Jensen, 1977).

Do weryfikacji mieszańców może także służyć porównanie wielkości genomów, oznaczanych w jądrach 2C, za pomocą np. cytometrii przepływowej. W mieszańcach generatywnych można spodziewać się wartości pośrednich DNA. W cytowanej powyżej pracy Morgan i wsp. (1998) analiza wielkości genomów wykazała dla *L. perezii*, *L. sinuatum* i mieszańca kolejno 8,69, 6,42 i 7,59 pg DNA. W mieszańcu somatycznym *Camelina sativa* + *Brassica oleracea* ilość DNA w jądrach 2C była sumą ilości DNA charakterystycznego dla jąder komórek wegetatywnych form rodzicielskich — 1,52, 1,29 i 2,83 (Hansen, 1998).

Przy nieodróżnianej liczbie chromosomów, identyfikację mieszańców można prowadzić na podstawie rozmiarów chromosomów. Dla przykładu, chromosomy jęczmienia są kilka razy dłuższe niż ryżu, co ułatwiło potwierdzenie prawdziwości mieszańca *Oryza sativa* + *Hordeum vulgare* (Kisaka i in., 1998 b) oraz mieszańca *Cucurbita pepo* × *C. martinii*, choć w tym przypadku różnice pomiędzy chromosomami są znacznie mniejsze (Metwally i in., 1996). Przy niewielkich różnicach, które są charakterystyczne np. dla gatunków tytoniu, porównywano całkowitą długość wszystkich chromosomów należących do genomów partnerskich (Giddings i Rees, 1992).

Chromosomy niektórych gatunków wykazują duże zróżnicowania morfologiczne, wynikające z położenia przewężenia pierwotnego — centromeru, dzielącego chromosom na ramiona różnej długości oraz z obecności i położenia przewężeń wtórnych, oddzielających odcinki satelitarne na ramionach. Te cechy były uwzględniane przy sporządzaniu kariotypów form rodzicielskich, służących do identyfikacji mieszańców międzygatunkowych w rodzajach *Lilium* (Uhring, 1968; Fernandez i in., 1996; Obata i in., 2000; Marasek i Orlikowska, 2001); *Astroemeria* (Rustanius i in., 1991) i *Clivia* (Ran i in., 1999).

Konwencjonalne techniki barwienia (odczynnik Shiffa, orceina, karmin) nie ujawniają różnic pomiędzy morfologicznie podobnymi lub małymi chromosomami, gdzie pozycje przewężeń są trudne do obserwacji, jak np. w rodzaju *Citrus* (cyt. za Miranda i in., 1997) czy *Ribes* (Keep, 1962; Marasek i Orlikowska, inf. ustna). Rozwój technik umożliwiających różnicowanie podłużne chromosomów przez ujawnianie intensywnie wybarwionych prążków poprzecznych dostarczył dodatkowych markerów, ułatwiających identyfikację genotypów. Jedną z nich jest technika prążków Ag-NOR (nucleolus organizer), która polega na wybarwianiu solami srebra regionów jąderkotwórczych (Hizume i in. 1980). Prążki Ag-NOR są zlokalizowane na ogół w miejscach przewężeń wtórnych (Matsui i Sasaki, 1973). Zróżnicowanie Ag-NOR było wykorzystane m.in. do identyfikacji mieszańców międzygatunkowych lili (Smyth i in., 1991), passiflory (Barbosa i Vieira, 1997) i chromosomowych linii addycyjnych zbóż (Santos i in., 1984).

Najczęściej stosowaną metodą wyznaczania pojedynczych chromosomów markerowych jest analiza obecności i położenia prążków C. Powstają one w wyniku usunięcia niektórych frakcji chromatyny przez wytrawianie zasadami, kwasami lub DNAzą i wybarwienie pozostałej treści chromosomów odczynnikami Giemsy. W ten sposób identyfikowano np. mieszańce lili (Smyth i Kongsuwan, 1980; Smyth, 1991; Marasek i Orlikowska, 2001), chromosomy żyta w liniach addycyjnych pszenżyta (Darvey i Gustafson, 1975) oraz analizowano kariotypy gatunków rodzaju *Clivia* (Ran i in., 1999). Metoda prążków C jest szczególnie

przydatna w badaniach nad mieszańcami żyta z pszenicą, ponieważ wzory prążkowe tych gatunków znacznie się różnią (Rogalska, 1999). Inną metodą różnicowania chromosomów jest wybarwianie prążków N, które podobnie jak prążki C odzwierciedlają lokalizację heterochromatyny konstytutywnej (Gill i in., 1991). Duży postęp w badaniach nad małymi i nieodróżnionymi morfologicznie chromosomami nastąpił w wyniku zastosowania barwień fluorescencyjnych, generujących prążki Q (po barwieniu quinakryną), DAPI (barwienie 4'-6-diamidyno-2-fenylindolem) lub CMA (chromomycyną A3), które tak jak prążki C są specyficznym rozmieszczone na chromosomach poszczególnych genotypów i mogą służyć do ich identyfikacji. Barwienia fluorescencyjne wykorzystano, m.in. do analizy cytogenetycznej gatunków *Brassica* (Hasterok i Małuszyńska, 1997) oraz do weryfikacji i charakteryzacji mieszańców międzygatunkowych w rodzaju *Citrus* (Miranda i in., 1997).

Konfiguracje meiotyczne i płodność pyłku

Chromosomy mieszańców międzygatunkowych na ogół wykazują brak lub niewielką homologię, co utrudnia lub uniemożliwia ich koniugację w mejozie. W metafazie obserwuje się wówczas obecność uniwalentów, a w anafazie chromosomy opóźnione. Nieprawidłowości w podziale meiotycznym były podstawą do identyfikacji mieszańców *Vigna unguiculata* × *V. vexillata* (Gomathinayagam i in., 1998), *Cucurbita pepo* × *C. martinii* (Metwally i in., 1996), *Erucastrum abyssinicum* × *Brassica oleracea* (Sarmah i Sarla, 1998), *Aegilops sp.* × *Secale cereale* (Wojciechowska, 1996). Zakłócenia w przebiegu mejozy prowadzą do powstawania nieplodnego pyłku i jest to kolejna cecha, która pomaga zweryfikować mieszańce oddalone (Arisumi, 1985; Wojciechowska, 1996; Ha i in., 1998; Morgan i in., 1998; Sarmah i Sarla, 1998; Choudhary i in., 2000). W przypadku, gdy krzyżowane genotypy wykazują dużą homologię chromosomów, w mejozie obserwuje się asocjacje biwalentne, a w mieszańcach somatycznych biwalentne, tetrawalentne lub triwalentne (w zależności od poziomu ploidalności partnerów), a płodność pyłku może nie być znacząco obniżona (Barbosa i Vieira, 1997).

Hybrydyzacja *in situ*

Metodą łączącą techniki molekularne i cytologiczne jest hybrydyzacja *in situ*. Metoda ta polega na przyłączaniu sondy DNA do homologicznego dla niej DNA w komórkach osadzonych na szkiełkach mikroskopowych (fluorescent *in situ* hybridization — FISH). Sondy sporządza się z dowolnych fragmentów DNA lub z całkowitego DNA partnerów (genomic *in situ* hybridization — GISH). Znakowanie wykonuje się najczęściej barwnikami fluorescencyjnymi, które wiążą się bezpośrednio z nukleotydami — rodaminą, kumaryną, fluoresceiną, 4'-6-diamidyno-2-fenylindolem (DAPI), chromomycyną lub quinakryną, a miejsca hybrydyzacji można obserwować w mikroskopie fluorescencyjnym, stosując filtry właściwe dla danego barwnika. DNA można także znakować biotyną lub digoksygeniną, wówczas miejsca hybrydyzacji są wykrywane za pomocą awidyny lub antydigoksygeniny, połączonych z cząsteczkami fluoryzującymi lub enzymami wytrącającymi chromogeniczny substrat (Schwarzacher i in., 1994). Ta metoda pozwala na określenie liczby chromosomów każdego z partnerów, a w kolejnych pokoleniach generatywnych także obecności oraz pozycji translokacji (Zwierzykowski i in., 1998; Molnár-Láng i in., 2000). Do weryfikacji mieszańców pierwotnych wystarcza analiza jąder późnej profazy, w których widać obecność kolorów sondy. Mieszańce pierwotne lub wtórne zweryfikowano w ten sposób w krzyżowaniach

międzygatunkowych w obrębie rodzajów *Allium* (Khrustaleva i Kik, 1998), *Lilium* (Lim i in., 2000; Marasek, i in., inf. ustna) oraz międzyrodzajowych *Hordeum chilense* × *Secale africanum* (Ananthawat-Jonsson i in., 1990)

MARKERY MOLEKULARNE

Markerami molekularnymi mogą być związki chemiczne, których obecność lub ilość w tkankach jest charakterystyczna dla genotypu. Mogą to być specyficzne białka lub izoformy białek, a szczególnie izoenzymy (Gavrilenko i in., 1992), cukry (Roh i in., 1996 b), fenole (Li i in., 1995) lub olejki lotne (Rodov i in., 1996). Mechanizm powstawania białek enzymatycznych sterujących biosyntezą analizowanych związków jest uruchamiany przez sekwencje rozwojowe lub w wyniku zaindukowania czynnikami zewnętrznymi. Z tego powodu niedogodnością wykorzystywania markerów będących rezultatem aktywności genów jest uzależnienie wyniku badania od warunków wzrostu, rodzaju tkanki, stadium rozwoju i stanu fizjologicznego rośliny. Radykalnym sposobem weryfikacji jest stosowanie markerów DNA (Pinto i in., 1995) — związku przenoszącego informację genetyczną, który jest najbardziej stały, obecny w każdej komórce i który nie musi być aktywny w czasie analizy.

Markery oparte na analizie cukrów i fenoli

Zawartość monocukrów mannozy i galaktozy w wydzielinie znamienia była cechą markerową w identyfikowaniu mieszańców *Lilium longiflorum* × *L. × elegans*. W mieszańcu stwierdzano wartości pośrednie pomiędzy formami rodzicielskimi, ale tylko wtedy, gdy analizę wykonywano na kwiatach z dużych cebul (Roh i in., 1996 b). Z tego powodu metoda ta była nieprzydatna do wczesnej identyfikacji mieszańców. Przeciwnie, analiza flawonoidów za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w potomstwie w/w partnerów wykazała, że profile mieszańców różniły się znacznie od rodzicielskich, a analiza mogła być wykonana w każdej fazie rozwoju roślin lili — w liściach, a nawet kalusie, z którego mieszańce zregenerowały. Markerem służącym do odróżnienia mieszańców irysa były proporcje barwników malwidyny i petunidyny. W formach rodzicielskich — *Iris ensata* i *I. laevigata* proporcje tych antocjanów oscylowały wokół 1:1, podczas gdy w mieszańcach autoallotetraploidalnych wynosiły 2:1 (Yabuya i Noda, 1998). Mieszańce somatyczne *Medicago sativa* + *Onobrychis vicifolia* weryfikowano na podstawie obecności w liściach tanin skondensowanych (Li i in., 1995). Związki te występują naturalnie w sparcecie, a pożądane są także w lucernie. Analiza ilościowa tanin była możliwa w wyniku barwienia liści aldehydem dwumetylo-aminocynamonowym (DMACA), a następnie pomiarów spektrofotometrycznych. Polifenole wykazują dużą zmienność strukturalną i ilościową nawet w różnych tkankach tej samej rośliny. Dlatego ważne jest określenie, który organ najlepiej charakteryzuje skład fenoli. Dla śliw mogą to być liście i owoce (Groh i in., 1994), dla pelargonii liście, a dla róży kora (Bauer, 1993). Analiza wymienionych związków może być wykonana za pomocą chromatografii cieczowej, spektrofotometrii UV lub magnetycznego rezonansu jądrowego. Technikę wykorzystującą magnetyczny rezonans zastosowano do odróżniania gatunków i mieszańców lili na podstawie stopnia uwodnienia łusek cebulowych (Roh i in., 1996 a).

Markery oparte na analizie białek konstytutywnych i enzymatycznych

Typowanie markerów na podstawie własności fizyko-chemicznych białek polega na rozdzieleniu elektroforetycznym ekstraktu białkowego i porównaniu obrazu rozdziału form rodzicielskich i badanego przypuszczalnego mieszańca. W przypadku wystąpienia na ścieżce elektroforetycznej weryfikowanego genotypu prążków charakterystycznych dla formy ojcowskiej, można wykluczyć zjawisko apomiksji i potwierdzić status mieszańcowy. Analiza fazeoliny była np. zastosowana do wykrywania przekrzyżowań w populacjach fasoli (Ferreira i in., 2000). Obecność enzymu chitynazy była podstawą do potwierdzenia mieszańcowości kalusa, powstałego z połączenia protoplastów cytryny i mieszańca pomarańczy z mandarynką, dawcy genu kodującego odporność na choroby grzybowe (Deng i in., 1994).

Jako markery są najczęściej typowane te enzymy, wśród których obserwuje się duży polimorfizm. Wynika on z tego, że enzymy są kodowane przez więcej niż jeden gen. Wraz ze wzrostem liczby genów kodujących dany enzym, wzrasta prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji, która powoduje zmianę w składzie aminokwasowym białka. Nawet jeden aminokwas w łańcuchu peptydowym może spowodować zmianę konformacji natywnego białka i zmienić jego mobilność w czasie elektroforezy. Enzymy o tych samych zdolnościach katalitycznych, ale różniące się właściwościami fizykochemicznymi, nazywane są izoenzymami (izozymami). Różnice w zestawie izoenzymów pozwalają na wyodrębnienie jednostek markerowych dla genotypów rodzicielskich i mieszańca, powstałego zarówno z krzyżowań oddalonych, jak i wewnątrzgatunkowych. Warunkiem koniecznym, aby można było zastosować tę metodę, jest obecność w formach rodzicielskich różnych wariantów allelicznych i ekspresja u spodziewanego mieszańca obu tych białek (Szklarczyk, 1996). Metwally i wsp. (1996) wykazali, że do weryfikacji mieszańca na podstawie polimorfizmu peroksydazy i albuminy konieczne jest nagromadzenie w tkance wystarczającej ilości enzymu, który na dodatek nie może posiadać wysokiego stopnia zakonserwowania ewolucyjnego.

Czynnikiem decydującym o wyborze konkretnych enzymów do analizy, jest ich rola w metabolizmie rośliny i powszechność występowania. Do identyfikacji mieszańców międzygatunkowych *Lilium* (Fernandez i in., 1996), *Vigna* (Gomathinayagam i in., 1998), międzyrodzajowych *Erucastrum abyssinicum* × *Brassica oleracea* (Sarmah i Sarla, 1998) oraz *Brassica* i *Sinapsis* (Momotaz i in., 1998) stosowano rozdział izoenzymów esterazy, peroksydazy i kwaśnej fosfatazy. Rozdział oksydaz polifenolowej i amonowej oraz liazy fenyloalaninowej zastosowano do weryfikacji mieszańców *Vigna* (Gamathanayagan i in., 1998), dehydrogenazy maleinianowej i izomerazy fosfoglukonowej do weryfikacji mieszańców róż (Kim i Byrne, 1996), a dehydrogenazy glutaminianowej do weryfikacji mieszańca somatycznego goździka i gipsówki (Nakano i Mii, 1993 a).

Analiza polimorfizmu enzymów jest metodą wiarygodną i skuteczną w wielu przypadkach. Warunkiem powodzenia jest wyizolowanie ekstraktu białkowego z tych części roślin, w których następuje ekspresja genów kodujących interesujący nas enzym oraz znalezienie różnic pomiędzy badanymi obiektami. Jednakże, aby ocenić aktywność i polimorfizm danego enzymu, trzeba zapewnić porównywalne warunki, w jakich wzrastają badane rośliny oraz izolować enzymy z takich samych tkanek, w tym samym stadium rozwoju, chociaż zakres tego wymogu jest uzależniony od roli określonego enzymu w metabolizmie (Weeden i Lamb, 1985; Bell i Simpson, 1994).

Techniką stosowaną do rozróżniania allelicznych form enzymu jest ogniskowanie izoelektryczne. Metoda ta wykorzystuje zmiany w wypadkowym ładunku elektrycznym białek (powstałe np. w wyniku zamiany jednego aminokwasu na inny, gdy ich łańcuchy boczne posiadają inną wartość ładunku), które ujawniają się w wyniku elektroforetycznego rozdziału w gradience pH. W ten sposób identyfikowano odmiany i mieszańce lili (Okazaki i in., 1994; Booy i in., 1998), mieszańce międzyrodzajowe *Hibiscus rosa-sinensis* i *Lavatera thuringiaca* (Vazquez-Thello i in., 1996) oraz mieszańce *Brassica* i *Sinapsis* (Momotaz i in., 1998).

Markery DNA uzyskiwane za pomocą enzymów restrykcyjnych i hybrydyzacji

Najstarszą techniką wyznaczania markerów DNA jest polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP). Genomowe DNA pocięte enzymami restrykcyjnymi na fragmenty o różnej długości jest rozdzielane elektroforetycznie, przenoszone na membrany i hybrydyzowane ze specyficznymi sondami DNA (metoda Southerna). Metoda identyfikacji hybrydujących fragmentów zależy od sposobu wyznakowania sondy (radiografia, luminescencja lub reakcja barwna). Obraz rozdziału i hybrydyzacji DNA różnych genomów może być odmienny nawet w przypadku jednonukleotydowej różnicy, jeśli powoduje ona powstanie lub zanik sekwencji rozpoznawanej przez restryktazę. Markery RFLP zastosowano m.in. do weryfikacji asymetrycznego mieszańca somatycznego *Lycopersicon esculentum* + *L. peruvianum* (Wijbrandi i in., 1990, cyt. Wolters i in., 1994), somatycznego mieszańca jęczmienia i marchwi (Kisaka i in., 1998 a), mieszańców somatycznych ryżu i jęczmienia (Kisaka i in., 1998 b), do potwierdzenia statusu mieszańcowego kalusa powstałego z połączenia protoplastów *Dianthus caryophyllus* i *Gypsophila paniculata* (Nakano i Mii, 1993 a) oraz *Dianthus chinensis* i *D. barbatus* (Nakano i Mii, 1993 b), do potwierdzenia mieszańcowości siewek ze skrzyżowań gatunków *Citrus* (Moriguchi i in., 1997), do badania udziału mitochondriów i plastydów partnerskich w somatycznych mieszańcach *Diplotaxis catholica* + *Brassica juncea* (Mohapatra i in., 1998), do analizy mieszańców pochodzących z krzyżowania *Brassica oleracea* i *A Armoracia rusticana* (Navratilova i in., 1997) oraz do weryfikacji mieszańca somatycznego lucerny ze sparcecią (Li i in., 1995). Wykorzystując hybrydyzację DNA do sondy sporządzonej z całkowitego DNA genomowego sparceci autorzy mogli wykryć obecność pojedynczych chromosomów sparceci w mieszańcu. Sondy genetyczne sporządzone z fragmentów restrykcyjnych były używane do weryfikacji mieszańców somatycznych *Solanum tuberosum* z wieloma gatunkami pokrewnymi (Helgeson i Haberlach, 1999).

Markery generowane techniką RFLP są szczególnie przydatne do badania obecności DNA cytoplazmatycznego występującego w dużej liczbie kopii, co powoduje, że polimorfizm widoczny jest już po rozdzieleniu elektroforetycznym i użycie sondy oraz hybrydyzacja nie są konieczne (Masojć, 2001). Wadą tej metody jest wysoki koszt enzymów restrykcyjnych oraz konieczność pracy z dużą ilością dobrze oczyszczonego i nieuszkodzonego DNA.

Markery oparte na technice powielania DNA

Odkrycie w 1985 roku łańcuchowej reakcji z polimerazą (PCR) stanowiło milowy krok w zastosowaniu markerów DNA. Technika ta pozwala na namnożenie w krótkim czasie małych fragmentów DNA do ilości wykrywalnych na żelu po wybarwieniu bromkiem etydy lub solami srebra. Produktami powielania są różnej długości fragmenty DNA, rozpoczynające się od sekwencji zastosowanego startera. Startery dobierane są losowo, bez wcześniejszego rozpoznania sekwencji nukleotydowej badanego genomu. Technika powielania występuje w

wielu wersjach, a główne różnice dotyczą długości startera (Bednarek i Chwedorzewska, 2001). Technika RAPD, najczęściej stosowana do identyfikacji mieszańców, polega na powielaniu fragmentów genomu, rozpoczynających się od sekwencji losowo dobranego startera o długości 8–12 nukleotydów. Starter przyłącza się do komplementarnego zdenaturowanego genomowego DNA. Obrazy elektroforetyczne tak namnożonego DNA uzyskuje się poprzez rozdział w żelu agarozowym i barwienie bromkiem etydyny. Do reakcji wystarcza 10–50 ng wstępnie oczyszczonego DNA, a nawet fragment żywej tkanki.

Techniki wykorzystujące amplifikację materiału genetycznego cechuje krótki czas analizy oraz prostota metod. Technikę tę zastosowano, m.in. do analizy mieszańców międzygatunkowych *Lactuca* (Maisonneuve i in., 1995), *Manihot* (Nassar i in., 1998), *Helianthus* (Henn, i in., 1998), *Solanum* (Hu i in., 1993, Rokka i in., 1998; Helgeson i Haberlach, 1999), *Lilium* (Obata i in., 2000, Wiejacha i in., 2001a), *Alstroemeria* (de Benedetti i in., 2000), a także do weryfikacji mieszańców w obrębie rodzajów *Acer* (Joung i in., 2001) oraz *Ribes* (Wiejacha i in., 2001 b i c).

Mieszane techniki markerów DNA

Sprzężenie techniki PCR z RFLP pozwala na tworzenie nowych metod genotypowania. W weryfikacji mieszańców oddalonych stosowano np. technikę polimorfizmu długości amplifikowanych fragmentów (AFLP). W pierwszym etapie genomowe DNA jest trawione restryktazą, a do powstałych fragmentów przyłącza się po obu stronach 20–30-nukleotydowe sekwencje adaptorowe. Takie konstrukcje analityczne (adaptor — fragment restrykcyjny — adaptor) służą jako matryca w reakcji amplifikacji, gdzie starter jest komplementarny do adaptoru na końcu 5', natomiast na końcu 3' posiada kilka dodatkowych nukleotydów, które pełnią rolę selekcyjną (Marczewski, 1997). Przykładem wykorzystania tej techniki może być identyfikacja asymetrycznych mieszańców, uzyskanych w wyniku fuzji protoplastów *Medicago truncatula* i *M. scutellata* (Tian i Rose, 1999) oraz *Cucurbita pepo* i *C. maxima* (Pfosser i in., 2000).

WERYFIKACJA MIESZAŃCÓW NA PODSTAWIE OBECNOŚCI GENÓW MARKEROWYCH WPROWADZONYCH METODĄ TRANSFORMACJI GENETYCZNEJ

Uprzednie wprowadzenie metodą transformacji genetycznej chimerycznych genów markerowych, kodujących np. syntezę barwnika, odporność na antybiotyk lub herbicyd umożliwia weryfikację mieszańców już w najwcześniejszym stadium. Selekcja na podstawie odporności na dwa antybiotyki została zastosowana do weryfikacji somatycznych mieszańców *Hibiscus rosa-sinensis* + *Lavatera thuringiaca* (Vazquez-Thello i in., 1996).

UWAGI KOŃCOWE

Status mieszańcowy można weryfikować w różny sposób, badając cechy charakterystyczne form rodzicielskich, obserwowane lub analizowane na różnych poziomach organizacji roślin. Najbardziej cenne są metody najmniej kosztowne i możliwe do wykonania w najkrótszym czasie i w jak najwcześniejszym stadium rozwoju siewki. Szczególnie istotne jest wykorzystanie cech markerowych związanych z regeneracją, ponieważ już na poziomie

kultury można wykonać selekcję. Taki sposób zastosowano przy wyprowadzaniu mieszańców międzygatunkowych pomidora z pomocą kultury zarodków *in vitro* (Chen i Adachi, 1996), gdzie potencjał regeneracyjny był dziedziczony po formie ojcowskiej. Jeśli nie można wykorzystać zróżnicowania morfologicznego siewek należy, w zależności od możliwości technicznych i specyfiki roślin, selekcjonować rzeczywiste mieszańce za pomocą uprzednio opracowanych markerów cytologicznych lub molekularnych. Markery cytologiczne mogą mieć zastosowanie przede wszystkim przy zróżnicowaniu liczby lub morfologii chromosomów form partnerskich. W przypadku gatunków o krótkim okresie juvenilnym weryfikację mieszańców można prowadzić na podstawie przebiegu pierwszej mejozy i płodności pyłku. Gdy markery cytologiczne nie mają zastosowania można posłużyć się metodami molekularnymi, polegającymi na stwierdzeniu obecności lub ilościowym określeniu różnych związków specyficznych dla form partnerskich, jak barwniki, taniny, olejki eteryczne lub niespecyficznych, jak białka konstytutywne, enzymatyczne lub fenole. Markery te są jednak zależne od ekspresji genów, poprzedzającej izolację związku. Coraz powszechniejsze stają się techniki markerowania DNA. Zostały one opisane m.in. w następujących publikacjach przeglądowych: Bednarek i Chwedorzewska (2001), Marczewski (1997), Masojć (2001), Słomski i wsp. (1998), Wolko i Kruszka (1997). Wyjątkową zaletą tych technik jest wysoka czułość, korzystanie z prób niewielkich ilości materiału roślinnego, co umożliwia analizę we wczesnym stadium rozwoju oraz skraca czas weryfikacji. Materiałem wyjściowym do analiz jest DNA, które występuje w każdej komórce, a więc metody te są niezależne od czynników zewnętrznych, wpływających na ekspresję genów. Podobnie jak w przypadku markerów izoenzymatycznych, różnicowanie poszczególnych odmian i gatunków oparte jest na różnicach w genomie, które mogły powstać na drodze ewolucji w wyniku mutacji punktowych. Jednak za pomocą markerów DNA nie bada się produktów kodowanych przez geny, lecz samą matrycę niosącą informację o produktach. Bardzo spektakularnym potwierdzeniem tego może być praca Cubero i wsp. (1996), gdzie przedstawiono porównanie markerów izoenzymatycznych z molekularnymi. Spośród 11 badanych systemów enzymatycznych tylko jeden nadawał się do różnicowania odmian róży, podczas gdy każdy z 8 przetestowanych starterów użytych do amplifikacji DNA był do tego celu użyteczny.

Nie ulega wątpliwości, że zastosowanie skutecznych, szybkich i łatwych metod identyfikacji mieszańców może znacznie zwiększyć efektywność hodowli. Dobre metody powinny zapewniać wysoki stopień standaryzacji — wyniki powinny być powtarzalne i jednoznaczne. Każda z wymienionych powyżej metod ma swoje wady i zalety, a ich skuteczność zależy od genotypu i warunków, w jakich są wykonywane. Wszystkie techniki, z wyjątkiem markerów morfologicznych, wymagają dostępu do odpowiednio wyposażonego laboratorium i osób przygotowanych do wykonywania specyficznych analiz. Jak wynika z literatury, potwierdzenie mieszańcowości, tak ważne dla dalszych prac hodowlanych, wykonuje się na ogół przy zastosowaniu kilku różnych technik, co przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Techniki zastosowane do weryfikacji mieszańców oddalonych F₁
Techniques applied for verification of distant hybrids F₁

Formy rodzicielskie i autorzy Parental forms and authors	Markery morfologiczne Morphological markers	Markery cytologiczne Cytological markers				
		Zawartość DNA DNA content	Liczba chromosomów Chromosome number	Morfologia chromosomów Chromosome morphology	Konfiguracje meiotyczne Meiotic configuration	Płodność pyłku Pollen fertility
<i>Aegilops</i> (3 species) × <i>Secale cereale</i> (Wojciechowska, 1996)	+		+	+	+	+
<i>Brassica oleracea</i> + <i>Armoracia rusticana</i> (Navratilowa i in., 1997)	+		+			
<i>Brassica campestris</i> × <i>Sinapis turgida</i> (Momotaz i in., 1998)	+		+			+
<i>Brassica oleracea</i> + <i>Camelina sativa</i> (Hansen, 1998)	+	+				
<i>Capsella bursa-pastoris</i> + <i>Brassica oleracea</i> (Sigareva i Earle, 1999)	+					
<i>Cucurbita pepo</i> × <i>C. martinii</i> (Metwally i in., 1996)	+			+	+	
<i>Helianthus annuus</i> + <i>H. maximiliani</i> (Henn i in., 1998)	+					
<i>Hordeum vulgare</i> + <i>Daucus carota</i> (Kisaka i in., 1998 a)	+					
<i>Hydrangea macrophylla</i> × <i>H. arborescens</i> (Kudo i Niimi, 1999)	+		+			
<i>Iris ensata</i> × <i>I. laevigata</i> (Yabuya i Noda, 1998)			+			+
<i>Lilium longiflorum</i> × <i>L. rubellum</i> (Lim i in., 2000)			+		+	
<i>Lilium longiflorum</i> × <i>L. callosum</i> (Roh i in., 1996)	+			+		
<i>Lilium nobilissimum</i> × <i>L. regale</i> (Obata i in., 2000)	+					
<i>Lycopersicon esculentum</i> + <i>L. peruvianum</i> (Wolters i in., 1994)	+					
<i>Lycopersicon esculentum</i> + <i>Solanum tuberosum</i> (Gavrilenko i in., 1992)	+		+		+	+
<i>Medicago media</i> i <i>M. sativa</i> × <i>M. arabica</i> , i <i>M. murex</i> (Broda i Szklarska-Spitalniak, 1997)			+			
<i>Medicago sativa</i> + <i>Onobrychis vicifolia</i> (Li i in., 1995)	+					
<i>Medicago truncatula</i> + <i>M. scutellata</i> (Tian i Rose, 1999)	+		+			
<i>Oryza sativa</i> + <i>Hordeum vulgare</i> (Kisaka i in., 1998 b)	+					
<i>Solanum acaule</i> + <i>S. tuberosum</i> (Rokka i in., 1998)	+	+	+			
<i>Triticum aestivum</i> + <i>Leymus chinensis</i> (Guangmin i Huimin, 1996)	+		+			

c.d. Tabela 2

Formy rodzicielskie i autorzy Parental forms and authors	Markery molekularne Molecular markers					Markery cytologiczno- molekularne Cytological- molecular markers
	Cukry i fenole Poly- saccharides and phenols	Izoenzymy Isoenzymes	DNA — restrykcyjno- hybrydyza- cyjne DNA — restriction- hybridization	DNA powielanie DNA amplification	DNA — techniki łączone Mixed techniques DNA	
<i>Aegilops</i> (3 species) × <i>Secale cereale</i> (Wojciechowska, 1996)						
<i>Brassica oleracea</i> + <i>Armoracia rusticana</i> (Navratilowa i in., 1997)			+			
<i>Brassica campestris</i> × <i>Sinapsis turgida</i> (Momotaz i in., 1998)		+				
<i>Brassica oleracea</i> + <i>Camelina sativa</i> (Hansen, 1998)				+		
<i>Capsella bursa-pastoris</i> + <i>Brassica oleracea</i> (Sigareva i Earle, 1999)		+		+		
<i>Cucurbita pepo</i> × <i>C. martinii</i> (Metwally i in., 1996)		+				
<i>Helianthus annuus</i> + <i>H. maximiliani</i> (Henn i in., 1998)				+		
<i>Hordeum vulgare</i> + <i>Daucus carota</i> (Kisaka i in., 1998 a)			+			
<i>Hydrangea macrophylla</i> × <i>H. arborescens</i> (Kudo i Niimi, 1999)				+		
<i>Iris ensata</i> × <i>I. laevigata</i> (Yabuya i Noda, 1998)	+					
<i>Lilium longiflorum</i> × <i>L. rubellum</i> (Lim i in., 2000)						+
<i>Lilium longiflorum</i> × <i>L. callosum</i> (Roh i in., 1996)	+					
<i>Lilium nobilissimum</i> × <i>L. regale</i> (Obata i in., 2000)		+		+		
<i>Lycopersicon esculentum</i> + <i>L. peruvianum</i> (Wolters i in., 1994)			+			
<i>Lycopersicon esculentum</i> + <i>Solanum tuberosum</i> (Gavrilenko i in., 1992)		+				
<i>Medicago media</i> i <i>M. sativa</i> × <i>M. arabica</i> , i <i>M. murex</i> (Broda i Szklarska-Śpitalniak, 1997)		+				
<i>Medicago sativa</i> + <i>Onobrychis viciifolia</i> (Li i in., 1995)	+		+			
<i>Medicago truncatula</i> + <i>M. scutellata</i> (Tian i Rose, 1999)					+	
<i>Oryza sativa</i> + <i>Hordeum vulgare</i> (Kisaka i in., 1998 b)			+			
<i>Solanum acaule</i> + <i>S. tuberosum</i> (Rokka i in., 1998)				+		
<i>Triticum aestivum</i> + <i>Leymus chinensis</i> (Guangmin i Huimin, 1996)		+				

LITERATURA

- Anamhawat-Jonsson K., Schwarzacher T., Leitch A. R., Bennett M. D., Heslop-Harrison J. S. 1990. Discrimination between closely related *Triticeae* species using genomic DANN as a probe. *Theor. Appl. Genet.* 79: 721 — 728.
- Arisumi T. 1980. Rescuing abortive *Impatiens* hybrids through aseptic culture of ovules. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 110: 273 — 276.
- Bajaj Y. P. S., Mahajan S. K., Labana K. S. 1986. Interspecific hybridization of *Brassica napus* and *B. juncea* through ovary, ovule and embryo culture. *Euphytica* 35: 103 — 109.
- Barbosa L. V., Vieira M. L. C. 1997. Meiotic behaviour of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener + *P. amethystina* Mikan. *Euphytica* 98: 121 — 127.
- Bauer H. 1993. Identification of “flower-sports” of pelargonium and roses by phenolic compounds. *Gartenbauwissenschaft* 58: 82 — 89.
- Bednarek P. T., Chwedorzewska, K. 2001. Markery molekularne, ich charakterystyka genetyczna oraz wybrane zastosowania w analizie genetycznej roślin. *Biotechnologia* 1 (52): 9 — 34.
- Bell J. A., Simpson D. W. 1994. The use of isoenzyme polymorphisms as an aid for cultivar identification in strawberry. *Euphytica* 77: 113 — 117.
- Belea A. 1992. Interspecific and intergeneric crosses in cultivated plants. Akademiai Kiado, Budapest.
- Booy G., Wouters T. C. A. E., Kleyn-Noordijk Y. 1998. Identification of lily cultivars using isoelectric focusing of proteins from bulb scales and tissue culture bulblets. *Plant Breeding* 117: 57 — 62.
- Broda Z., Szklarska-Śpitalniak H. 1997. Cytogenetyczna i izoenzymatyczna analiza mieszańców międzygatunkowych lucerny. *Mat. I Krajowej Konferencji “Hodowla Roślin”*, Poznań: 475 — 478.
- Chen L. Z., Adachi T. 1996. Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via ‘embryo rescue’ and *in vitro* propagation. *Plant Breeding* 115: 251 — 256.
- Choudhary B. R., Joshi P., Ramarao S. 2000. Interspecific hybridization between *Brassica carinata* and *Brassica rapa*. *Plant Breeding* 119: 417 — 420.
- Chung G. H., Kim J. H. 1990. Production of interspecific hybrids between *Glycine max* and *G. tomentella* through embryo culture. *Euphytica* 48: 97 — 101.
- Cubero J., I., Millan, T., Osuna, F., Torres, A., M., Cobos, S. 1996. Varietal identification in *Rosa* by using isozyme and RAPD markers. *Acta Horticulturae* 424: 261 — 264.
- Darvey N. L., Gustafson J. P. 1975. Identification of rye chromosomes in wheat-rye addition lines and triticale by heterochromatin bands. *Crop Sci.* 15: 239 — 243.
- De Benedetti L., Burchi G., Mercuri A., Pecchioni N., Faccioli P., Schiva T. 2000. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for the verification of hybridity in interspecific crosses of *Alstroemeria*. *Plant Breeding* 119: 443 — 445.
- Deng Z. N., Gentile A., Domina A., Nicolosi E., Tribulato E., Vardi A. 1994. Recovery of citrus somatic hybrids tolerant to *Phoma tracheiphila* toxin, combining selection and identification by RAPD markers. In: *Current issues in plant molecular and cellular biology*. Terzi M., Cella R., Fallavigna A. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 177 — 183.
- Fernandez, A., M., Nakazaki, T., Tanisaka, T. 1996. Development of diploid and triploid interspecific hybrids between *Lilium longiflorum* and *L. concolor* by ovary slice culture. *Plant Breeding* 115: 167 — 171.
- Ferreira J. J., Alvarez E., Fueyo M. A., Roca A., Giraldez R. 2000. Determination of the outcrossing rate of *Phaseolus vulgaris* L. using seed protein markers. *Euphytica* 113: 259 — 263.
- Gavrilenko T. A., Barbakar N. I., Pavlov A. V. 1992. Somatic hybridization between *Lycopersicon esculentum* and non-tuberous *Solanum* species of the *Etuberosa* series. *Plant Science* 86: 203 — 214.
- Giddings G. D., Rees H. 1992. A *Nicotiana* gametosomatic hybrid and its progenies. *J. Exp. Bot.* 43: 419 — 425.
- Gill B. S., Friebe B., Endo T. R. 1991. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). *Genome* 34: 830 — 839.
- Gomathinayagam P., Ganeshram S., Rathnaswamy R., Ramaswamy N. M. 1998. Interspecific hybridization between *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *V. vexillata* (L.) A. Rich. through *in vitro* embryo culture. *Euphytica* 102: 203 — 209.

- Groh B., Bauer H., Treutter D. 1994. Chemotaxonomical investigations of *Prunus domestica* by isoenzyme markers and phenolic compounds. *Scientia Horticulturae* 58: 41 — 55.
- Guangmin X., Huimin C. 1996. Plant regeneration from intergeneric somatic hybridization between *Triticum aestivum* L. and *Leymus chinensis* (Trin.) Tzvel. *Plant Sci.* 120: 197 — 203.
- Ha S., Maekawa M., Kita F., Kinoshita T. 1998. Cytological relationships among *Eumelilotus* species analysed using cytological observations of interspecific hybrids obtained by *in vitro* culture. *Euphytica* 101: 17 — 22.
- Hansen L. N. 1998. Intertribal somatic hybridization between rapid cycling *Brassica oleracea* L. and *Camelina sativa* (L.) Crantz. *Euphytica* 104: 173 — 179.
- Hasterok R., Małuszyńska J. 1997. Analiza cytogenetyczna wybranych gatunków *Brassica*. Mat. konf. Hodowla Roślin. Poznań: 467 — 473.
- Helgeson J. P., Haberland G. T. 1999. Somatic hybrids of *Solanum tuberosum* and related species. In: Plant biotechnology and *in vitro* biology in the 21st century. Altman A., Ziv M., Izhar S. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 151 — 154.
- Henn, H. J., Wingerder, R., Schnabi, H. 1998. Regeneration of fertile interspecific hybrids from protoplast fusions between *Helianthus annuus* L. and wild *Helianthus* species. *Plant Cell Rep.* 18: 220 — 224.
- Hizume M., Sato S., Tanaka A. 1980. A highly reproducible method of nucleolus organizing regions staining in plants. *Stain Technology* 55: 87 — 90.
- Hu Y. S., Clark M. S., Pehu E. 1993. Use of RAPD markers to screen somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*. *Plant Cell Reports* 12: 107 — 109.
- Jensen C. J. 1977. Monoploid production by chromosome elimination. In: Plant cell tissue, and organ culture. Reinert J., Bajaj Y. P. S. (eds.). Springer-Verlag, Berlin: 299 — 330.
- Joung Y. H., Roh M. S., Bentz S. E. 2001. Characterization of *Acer griseum* and its putative interspecific hybrids. *Acta Horticulturae* 546: 217 — 220.
- Keep E. 1962. Satellite and nucleolar number in hybrids between *Ribes nigrum* and *R. grossularia* and their backcrosses. *Can. J. Genet. Cytol.* 4: 206 — 218.
- Keep E. 1975. Currants and gooseberries. In: Advances in fruit breeding. Janick J., Moore J. (eds.), Purdue University Press, West Lafayette: 197 — 242.
- Khrustaleva L. I., Kik C. 1998. Cytogenetical studies in the bridge cross *Allium cepa* × (*A. fistulosum* × *A. roylei*). *Theor. Appl. Genet.* 96: 8 — 14.
- Kim Y., Byrne D. H. 1996. Interspecific hybrid verification of *Rosa* with isosymes. *HortScience* 31: 1207 — 1209.
- Kisaka H., Kisaka M., Kanno A., Kameya T. 1998 a. Production and analysis of plants that are somatic hybrids of barley (*Hordeum vulgare* L.) and carrot (*Daucus carota* L.). *Theor. Appl. Genet.* 94: 221 — 226.
- Kisaka H., Kisaka M., Kanno A., Kameya T. 1998 b. Intergeneric somatic hybridization of rice (*Oryza sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) by protoplast fusion. *Plant Cell. Rep.* 17: 362 — 367.
- Kucharska D., Orlikowska T. 1997. Kultury *in vitro* zarodków, zalążków i zalążni oraz znaczenie tych technik dla hodowli roślin ozdobnych. *Hod. Rośl. Nasien.* 4: 11 — 16.
- Kudo N., Niimi Y. 1999. Production of interspecific hybrid plants through cotyledonary segment culture of embryos derived from crosses between *Hydrangea macrophylla* f. *hortensia* (Lam.) Rehd. and *H. arborescens*. L. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 68: 803 — 808.
- Ladizinsky G. 2000. A synthetic hexaploid (2n = 42) oat from the cross of *Avena strigosa* (2n = 14) and domesticated *A. magna* (2n = 28). *Euphytica* 116: 231 — 235.
- Li Y. G., Tanner G. J., Larkin P. J. 1995. Towards producing bloat-safe *Medicago sativa* L. through protoplast fusion. In: Current issues in plant molecular and cellular biology. Terzi M., Celia R., Falavigna A. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 185 — 190.
- Lim K. B., van Tuyl J. M., Karlov G. I., Khrustaleva L. I., de Jong J. H. 2000. Introgression of interspecific hybrids of lily using genomic *in situ* hybridization (GISH). *Acta Horticulturae* 508: 105 — 111.
- Maisonneuve B., Chupeau M.C., Bellec Y., Chupeau Y. 1995. Sexual and somatic hybridization in the genus *Lactuca*. *Euphytica* 85: 281 — 285.
- Marasek A., Orlikowska T. 2001. Identyfikacja mieszańców oddalonych lilii w oparciu na markerach chromosomowych. *Biotechnologia* 3 (54): 243 — 248.

- Marczewski W. 1997. AFLP — nowa metoda badawcza w genetyce roślin. *Biotechnologia* 2 (37): 121 — 126.
- Masojć P. 2001. Ustalanie tożsamości genetycznej. W: *Biotechnologia roślin*. Malepszy S. (red.), PWN, Warszawa: 485 — 519.
- Matsui S. I., Sasaki M. 1973. Differential staining of nucleolus organisers in mammalian chromosomes. *Nature* 246: 148 — 150.
- Metwally E. I., Haroun S. A., El-Fadly G. A. 1996. Interspecific cross between *Cucurbita pepo* L. and *Cucurbita martinii* through *in vitro* embryo culture. *Euphytica* 90: 1 — 7.
- Miranda M., Ikeda F., Endo T., Moriguchi T. 1997. Chromosome markers and alterations in mitotic cells from interspecific somatic hybrids analysed by fluorochrome staining. *Plant Cell Reports* 16: 807 — 812.
- Moriguchi T., Motomura T., Hidaka T., Akihamo T., Omura M. 1997. Analysis of mitochondrial genomes among *Citrus* plants produced by the interspecific somatic fusion of 'Semina' tangelo with rough lemon. *Plant Cell Reports* 16: 397 — 400.
- Mohapatra T., Kirti P. B., Kumar V. D., Prakash S., Chopra V. L. 1998. Random chloroplast segregation and mitochondrial genome recombination in somatic hybrid plants of *Diplotaxis catholica* + *Brassica juncea*. *Plant Cell Reports* 17: 814 — 818.
- Molnár-Láng M., Linc G., Friebe B. R., Sutka J. 2000. Detection of wheat-barley translocations by genomic *in situ* hybridization in derivatives of hybrids multiplied *in vitro*. *Euphytica* 112: 117 — 123.
- Momotaz A., Kato M., Kakihara F. 1998. Production of intergeneric hybrids between *Brassica* and *Sinapsis* species by means of embryo rescue techniques. *Euphytica* 103: 123 — 130.
- Morgan E. R., Burge G. K., Seelye J. F., Hopping M. E., Grant J. E. 1998. Production of inter-specific hybrids between *Limonium perezii* (Stapf) Hubb. and *Limonium sinuatum* (L.) Mill. *Euphytica* 102: 109 — 115.
- Nair N. V., 1999. Production and cyto-morphological analysis of intergeneric hybrids of *Sorghum* × *Saccharum*. *Euphytica* 108: 187 — 191.
- Nakano M., Mii M. 1993 a. Somatic hybridization between *Dianthus chinensis* and *D. barbatus* through protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 86: 1 — 5.
- Nakano M., Mii M. 1993 b. Callus and root formation from an intergeneric somatic hybrid between *Dianthus caryophyllus* and *Gypsophila paniculata*. *Scientia Horticulturae* 53: 13 — 19.
- Nassar N. M. A., Vieira M. A., Vieira C., Grattapaglia D. 1998. A molecular and embryonic study of apomixis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica* 102: 9 — 13.
- Navrátilová B., Bůžek J., Šíroky J., Havránek J. 1997. Construction of intergeneric somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *Armoracia rusticana*. *Biol. Plantarum* 39: 531 — 541.
- Niemirówicz-Szczytt K., Malepszy S. 1989. Otrzymywanie i wykorzystanie mieszańców form oddalonych. W: *Biotechnologia w genetyce i hodowli roślin*. Malepszy S., Niemirówicz-Szczytt K., Przybecki Z. (red.). PWN, Warszawa: 81 — 150.
- North C., Wills A. B. 1969. Inter-specific hybrids of *Lilium lankongense* Franchet produced by embryo-culture. *Euphytica* 18: 430 — 434.
- Obata Y., Niimi Y., Nakano M., Okazaki K., Miyajima I. 2000. Interspecific hybrids between *Lilium nobilissimum* and *L. regale* produced via ovules-with-placenta-tissue culture. *Scientia Horticulturae* 84: 191 — 204.
- Okazaki K., Asano Y., Oosawa K. 1994. Interspecific hybrids between *Lilium* 'Oriental' hybrid and *L.* 'Asiatic' hybrid produced by embryo culture with revised media. *Breeding Science*: 44: 59 — 64.
- Pinto F. M., Chupeau Y., Cabrera V. M. 1995. Molecular genetic characterization of plant somatic hybrids. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 31: 96 — 100.
- Pfosser H., Yemelyanova H., Leonhardt W. 2000. Identification of cultivars and hybrids in *Syringa* and *Cucurbita* by DNA fingerprinting. *Acta Horticulturae* 530: 455 — 462.
- Ran Y., Murray B. G., Hammett K. R. W. 1999. Karyotype analysis of the genus *Clivia* by Giemsa and fluorochrome banding and *in situ* hybridization. *Euphytica* 106: 139 — 147.
- Rodov V., Reznickova S., Bugaenko L., Davydova O. 1996. Tissue and cell cultures of interspecific mint hybrids: peculiarities of monoterpene accumulation. *Acta Horticulturae* 447: 607 — 608.
- Rogalska S. 1999. Zastosowanie metod cytogenetycznych w badaniach genetycznych i w hodowli roślin. W: *Podstawy cytogenetyki roślin*, Olszewska M. J. (red.). PWN, Warszawa: 177 — 209.

- Roh M. S., Griesbach R. J., Gross K. C., Line M. 1996 a. Identification and evaluation of the interspecific hybrid of *Lilium longiflorum* and *L. callosum*. *Acta Horticulturae* 414: 111 — 124.
- Roh M. S., Griesbach R. J., Lawson R. H., Gross K. C. 1996 b. Production and identification of interspecific hybrids of *Lilium longiflorum* and *L. × elegans*. *Acta Horticulturae* 414: 93 — 100.
- Rokka V.M., Tauriainen A., Pietila, Pehu E. 1998. Interspecific somatic hybrids between wild potato *Solanum acaule* Bitt. and anther-derived dihaploid potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Reports* 18: 82 — 88.
- Rustanius P., Hang A., Hughes H. G., Tsuchiya T. 1991. Chromosome analysis of *Alstroemeria ligtu* hybrids. *HortScience* 26: 902 — 904.
- Santos J. L., Lacadena J. R., Cermeiro M.C., Orellana J. 1984. Nuclear organizer activity in wheat-barley chromosome addition lines. *Heredity* 52: 425.
- Sarmah, B., K., Sarla N. 1998. *Erucastrum abyssinicum* × *Brassica oleracea* hybrids by ovary and ovule culture. *Euphytica* 102: 37 — 45.
- Schwarzacher T., Leitch A. R., Heslop-Harrison J. S. 1994. DNA-DNA *in situ* hybridization — methods for light microscopy. In: *Plant cell biology: a practical approach*, Harris N., Oparka K. (eds.), Oxford University Press: 127 — 155.
- Sigareva M. A., Earle E. D. 1999. Regeneration of plants from protoplasts of *Capsella bursa-pastoris* and somatic hybridization with rapid cycling *Brassica oleracea*. *Plant Cell Reports* 18: 412 — 417.
- Smyth D. R., Kongsuwan K. 1980. C-bands in lily chromosomes, and their use in identification of hybrids. *The Lily Yearbook NALS* 33: 83 — 86.
- Smyth D. R., Kongsuwan K., Wisudharomin S. 1991. A survey of C-band patterns in chromosomes of *Lilium* (*Liliaceae*). *The Lily Yearbook NALS* 44: 107 — 118.
- Słomski R., Napierała D., Kwiatkowska J. 1998. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) w badaniach naukowych i diagnostyce molekularnej. *Postępy Biologii Komórki* 25, Suppl. 10: 195 — 217.
- Szklarczyk M. 1996. Markery izoenzymatyczne. W: *Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin*. Michalik B. (red.), Drukrol, Kraków: 90 — 93.
- Tian D., Rose R. J. 1999. Asymmetric somatic hybridisation between the annual legumes *Medicago truncatula* and *Medicago scutellata*. *Plant Cell Reports* 18: 989 — 996.
- Uhring J. 1968. Hybridizing experiments with *Lilium* × Black Beauty. *The Lily Yearbook NALS* 21: 44 — 52.
- Vazquez-Thello A., Yang L.J., Hidaka M., Uozumi T. 1996. Inherited chilling tolerance in somatic hybrids of transgenic *Hibiscus rosa-sinensis* × transgenic *Lavatera thuringiaca* selected by double-antibiotic resistance. *Plant Cell Reports* 15: 506 — 511.
- Weber S., Horn R., Friedt W. 2000. High regeneration potential *in vitro* of sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines derived from interspecific hybridization. *Euphytica* 116: 271 — 280.
- Weeden N. F., Lamb R. C. 1985. Identification of apple cultivars by isozyme phenotypes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 110: 509 — 515.
- Wiejacha K., Marasek A., Sabała I., Orlikowska T. 2001 a. Molecular markers in detection of distant hybrids in *Lilium*. *Acta Horticulturae* 546: 281 — 285.
- Wiejacha K., Pluta S., Golis A., Orlikowska T. 2001 b. Identyfikacja mieszańców porzeczki czarnej przy pomocy markerów RAPD. *Folia Horticulturae* 13/1A: 183 — 188.
- Wiejacha K., Pluta S., Golis A., Orlikowska T. 2001 c. Investigation on molecular markers for characterization of parental genotypes used in *Ribes* sexual hybridization. *Acta Horticulturae*: 185 — 188.
- Wojciechowska B. 1996. Hybrids of tetraploid *Aegilops* sp. with *Secale cereale*. *J. Appl. Genetics* 37A: 174 — 178.
- Wolko B., Kruszka K., 1997. Markery molekularne w badaniach zmienności genetycznej roślin. *Post. Nauk Rol.* 3: 3 — 20.
- Wolters A.M., Jacobsen E., O'Connell M., Bonnema G., Sree Ramulu K., de Jong H., Schoenmakers H., Wijbrandi J., Koornneef M. 1994. Somatic hybridization as a tool for tomato breeding. *Euphytica* 79: 265 — 277.
- Yabuya T., Noda T. 1998. The characterization of autoallotetraploid hybrids between *Iris ensata* Thunb. and *I. laevigata* Fisch. *Euphytica* 103: 325 — 328.
- Zenkter M. 2001. Kultura zalążków, zalążni, i zarodków. W: *Biotechnologia roślin*. Malepszy S. (red.). PWN, Warszawa: 70 — 86.

Zwierzykowski Z., Lukaszewski A. J., Lesniewska A., Naganowska B. 1998. Genomic structure of androgenic progeny of pentaploid hybrids, *Festuca arundinacea* × *Lolium multiflorum*. Plant Breeding 117: 457 — 462.

Podziękowania

Autorki dziękują paniom prof. Stanisławie Rogalskiej i dr hab. Marii Chrząstek za udostępnienie brakującej literatury, a pani prof. Rogalskiej i panu dr Waldemarowi Marczewskiemu za pomocną dyskusję.