

## EWOLUCJA ROZMIARÓW GENOMÓW JĄDROWYCH U ROŚLIN OKRYTOZALĄŻKOWYCH\*

EVOLUTION OF NUCLEAR GENOME SIZE IN ANGIOSPERM PLANTS

Maria Joanna OLSZEWSKA, Tomasz SAKOWICZ

Zakład Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin Uniwersytetu Łódzkiego

*Streszczenie:* W ciągu minionych kilku lat znacznie wzbogaciła się wiedza o ewolucji zawartości jądrowego DNA. U okrytozalachkowych rozmiary genomu różnią się ponad 1000-krotnie. W odległej przeszłości następowała poliploidyzacja genomów. Znaczne różnice rozmiarów genomów są spowodowane głównie przez odmienną liczbę rund duplikacji u przodków oraz przez inwazję retroelementów. Liczba retroelementów jest dodatnio skorelowana z rozmiarami genomu. W wyniku podwajania liczby genów następowała ich dywergencja (subfunkcjonalizacja), zatem duplikacja genomów stała się potężną siłą napędową w ewolucji. Rozmiary genomu są dodatnio skorelowane z czasem trwania cyklu życiowego, cyklów mitotycznych i mejotycznych oraz z objętością jądra. Redukcja rozmiarów genomów zachodzi u naturalnych auto- i allopoliploidów. W przeciwieństwie do gatunków z małym genomem, gatunki z dużymi genomami, bogatymi w retroelementy charakteryzują się niskim potencjałem adaptacyjnym i obniżoną dywergencją, są eliminowane ze środowisk o krańcowych warunkach i zagrożone wyginięciem. Te stwierdzenia wydają się wskazywać na ewolucyjną tendencję w kierunku redukcji rozmiarów genomów.

*Słowa kluczowe:* ewolucja rozmiarów genomów, podwojenie genów i genomów, retroelementy, adaptacja.

*Summary:* Our understanding of the evolution of DNA content in angiosperm plants has improved in recent years. Genomes in angiosperms vary in DNA content over 1000-fold. Variations in plant genome size are primarily due to differences in ancestral polyploidy and the periodic burst in activity of retroelements. Genomic data show a strong correlation between the size of genome and the amount of retroelements. Gene duplication have contributed to the functional divergence of the duplicates, and have become a strong evolutionary force. Genome size also correlates with the span of life cycle, duration of mitotic and meiotic cycles, and nuclear volumes. Reduction of genome size occurs in natural auto- and allopolyploids. Species with large genomes saturated with retroelements do not adapt well and are underrepresented in extreme environments. These species tend to diverge slowly and hence are threatened with extinction over time. The above findings provide basis for evolutionary trends to reduce nuclear genome size in plants.

*Key words:* genome size evolution, gene and genome duplication, retroelements, adaptation.

\*Praca finansowana z badań statutowych Uniwersytetu Łódzkiego nr 505/04996.

## 1. WSTĘP

Badania rozmiarów genomów jądrowych u Eukaryota stały się możliwe po wprowadzeniu metod cytometrycznych pomiaru zawartości DNA bądź *in situ*, bądź na izolowanych jądrach. Jako pierwsze zostały wprowadzone mikrodensytometryczne metody *in situ* po zabarwieniu DNA metodą Feulgena, a następnie – cytometrii przepływowej z zastosowaniem jąder izolowanych. Poprawnemu przeprowadzeniu badań przy użyciu obu tych metod poświęcono wiele uwagi. Wiadomo, że wyniki uzyskane obiema metodami są porównywalne [23], (ref. [35]). Ustalenie szczegółowe postępowania w metodzie cytometrii przepływowej jest ciągle jeszcze tematem licznych opracowań [5, 11, 34, 35]. Wyniki dotyczące rozmiaru genomu u roślin, tj. zawartości w nich DNA, wyrażone w pg lub liczbą par zasad (pz) są gromadzone w banku danych – *The Plant DNA C-values Database* ([www.rbk.kew.org.uk/cval/homepage.html](http://www.rbk.kew.org.uk/cval/homepage.html)); ostatnie dane są podane przez Bennetta i Leitcha [5]. Definicja pojęcia 1C i 2C jest szeroko dyskutowana, szczególnie w odniesieniu do królestwa roślin, wśród których, głównie wśród okrytozalążkowych, dominują gatunki allopoliploidalne [17]. W niniejszym artykule przyjęto, że 1C to zawartość DNA w niezreplikowanych komórkach haploidalnych, 2C – w fazie  $G_0$  lub  $G_1$  cyklu komórkowego.

Już wkrótce po uzyskaniu szeregu danych dotyczących zawartości DNA w komórkach haploidalnych lub diploidalnych okazało się, że w królestwie roślin, zwierząt i grzybów brak jest spójności między poziomem rozwoju ewolucyjnego a rozmiarami genomu. Zjawisko to nazwano paradoksem C DNA (ref. [37]). Polega ono na fakcie, że kodowanie białek lub rRNA i tRNA nie jest jedyną funkcją DNA w genomie [8]. Co prawda, porównanie 1C DNA u roślin lądowych: mszaków (0,53 pg), widłaków (3,81), paprotników i innych grup zaliczanych do *Monilophyta* (13,58 pg), nagozalążkowych (16,99 pg) i okrytozalążkowych (6,30 pg) wskazuje, że w królestwie roślin prawidłowość taka istnieje w wymienionych grupach do nagozalążkowych włącznie, ale brak jej w obrębie roślin okrytozalążkowych stojących najwyżej w ewolucji. U roślin okrytozalążkowych różnice w rozmiarach genomów są przeszło 1000-krotne (od 0,11 pg do 127,40 pg), zaś u mszaków – zaledwie 12-krotne (ref. [27]). U glonów natomiast rozpiętość rozmiarów genomów jest 1300-krotna [15]. Uwzględnienie rozmiarów genomów przy konstruowaniu dendrogramów opartych na danych taksonomicznych i aktualnych poglądach na pokrewieństwa w obrębie danej grupy wykazało, że wskutek znacznej zmienności rozmiarów genomów nawet w obrębie rodzaju i gatunku (por. rozdz. 5.) ta cecha jest mało przydatna w analizach filogenetycznych [27].

Podstawowym odkryciem, które stało się punktem wyjścia do dalszych badań wyjaśniających paradoks C DNA i ewolucji rozmiarów genomu, stało się wykazanie przez Flavella i wsp. [12, 13] wysokiej dodatniej korelacji między rozmiarami genomu (w pg DNA) a zawartością sekwencji powtarzalnych (również w pg DNA) oraz stwierdzenie, że w toku ewolucji, począwszy od 200 milionów lat temu, genomy roślin w znacznej mierze, a w mniejszym stopniu genomy zwierząt ulegały kolejnym cyklom poliploidyzacji (ref. [1]).

Od 1998 r. istnieje międzynarodowa grupa skupiona wokół badań genomu roślin okrytozalążkowych, organizująca co kilka lat warsztaty pod nazwą „*Angiosperm Genome Size Workshop*” [4]. Dzięki działalności tej grupy, badania ewolucji rozmiarów genomów u roślin są intensywnie prowadzone, a uzyskiwane wyniki są dyskutowane i publikowane w kolejnych numerach *Annals of Botany* (ostatnio w nr 1, tom 95 w 2005 r.). Organizatorzy tej grupy wyrazili nadzieję, że „... *increased knowledge and understanding of genome size will contribute to holistic genomic studies in both plants and animals in the next decade*” [4]. Redakcja *Postępów Biologii Komórki* zamieszcza zatem obok siebie artykuły dotyczące królestwa roślin i królestwa zwierząt.

Rola poliploidyzacji i udział sekwencji powtarzalnych ze szczególnym uwzględnieniem ruchomych elementów w ewolucji rozmiarów genomu u roślin okrytozalążkowych zostaną omówione poniżej. Ze względu na w miarę dobrze poznaną strukturę genomu u roślin uprawnych i u modelowego gatunku *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik) z jednym z najmniejszych genomów (1C DNA = 0,2 pg = 157 Mbp), głównie tych roślin dotyczą przedstawiane wyniki.

## 2. POLIPLOIDYZACJA I EWOLUCJA GENOMU

Poliploidyzacja genomów jądrowych w toku ewolucji przebiegała z większą częstotliwością u roślin niż u zwierząt, wśród których dobrze udokumentowane przykłady odnoszą się do kręgowców i owadów (ref. [2]). Wśród roślin okrytozalążkowych poliploidyzacji uległo 70–80% gatunków. Nie wszystkie ulegały takiej samej liczbie rund poliploidyzacji; ich liczba w ciągu 200 milionów lat przypuszczalnie wyniosła od 2 do 5 (ref. [28]), a najstarsze – paleopoliploidy – powstały wiele setek milionów lat temu. Duplikacja genomu miała miejsce nawet u gatunków żyjących współcześnie z tak małym genomem jak *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik) i *Oryza sativa* (ryż). Duplikacja genomu powoduje istotne skutki zarówno na poziomie molekularnym, jak i genotypowym. Skutkiem poliploidyzacji była przebudowa genomu, duplikacje segmentalne i częściowa utrata lub modyfikacja sekwencji kodujących, zaś u allopoliploidów – translokacje międzygenomowe (por. rozdz. 5.). W świetle danych z zakresu molekularnej analizy genomów można przyjąć, że jedna runda podwojenia genomów miała miejsce po dywergencji dwuliściennych, a druga – po dywergencji rodzajów *Arabidopsis* i *Brassica* z ich wspólnego przodka – zapewne *Gossypium* (bawełna) (ref. [1]).

Brak wszystkich podwojonych genów we współczesnych genomach, których przodkowie ulegli poliploidyzacji, jest objaśniany przez utratę niektórych powtórzonych sekwencji (por. rozdz. 3. i 4.). Zróznicowana eliminacja powtórzonych sekwencji – zarówno kodujących, jak i niekodujących – po poliploidyzacji jest przyczyną istnienia wśród spokrewnionych gatunków licznych odchyłeń w kolinearności genów (ang. *co-linearity of genes*), tj. w liniowym ułożeniu genów w tym samym chromosomie. Taka sytuacja występuje u zbóż. Skumulowany efekt obu procesów, tj. podwojenia genomu i utraty genów doprowadził do powstania współczesnych genomów u roślin okrytozalążkowych, u których istnieje syntenia z tylko częściowym sprzężeniem genów (ref. [1]).

### 3. GENY W GENOMACH PODWOJONYCH W TOKU EWOLUCJI

W wyniku poliploidyzacji w odległej przeszłości następowało podwojenie liczby genów. Podczas ewolucji sekwencje kodujące mogą być utracone, zmutowane lub ulec wyciszeniu.

Fakt, że zduplikowane geny są zachowywane w sposób nieprzypadkowy, sugeruje, że poliploidyzacja dostarcza materiału genetycznego umożliwiającego adaptację poprzez dywergencję (por. rozdz. 6.). U *Arabidopsis* co najmniej połowa genów powstałych w wyniku niedawnej poliploidyzacji (tj. ok. 5 milionów lat temu) ma odmienny wzór ekspresji. Geny takie uległy funkcjonalnemu zróżnicowaniu, a w konsekwencji nastąpiła dywersyfikacja szlaków metabolicznych i dywersyfikacja ewolucyjna [1].

Częstym wynikiem modyfikacji podwojonych genów jest ich tzw. subfunkcjonalizacja; jest to proces zwany DDC (ang. *Duplicate, Degenerate, Complement*), podczas którego w wyniku mutacji następuje częściowa utrata funkcji (ref. [22, 41]). Geny regulatorowe, jak np. czynniki transkrypcyjne, są uznawane za dobry przykład funkcjonalnej i regulatorowej dywersyfikacji w rodzinach zduplikowanych genów. U *Arabidopsis thaliana* powielone geny uczestniczą w reakcjach obronnych przeciwko pasożytom roślinożernym, transdukcji sygnałów i regulacji ekspresji (ref. [32]).

Dobrym przykładem losów podwojonych genów, które uległy subfunkcjonalizacji, jest rodzina genów z kasety MADS, które są zaangażowane w kontrolę procesów kwitnienia. W toku ewolucji te geny zwielokrotnione wskutek kolejnych rund poliploidyzacji uległy daleko posuniętej specjalizacji (subfunkcjonalizacja), kontrolując inicjację merystemu kwiatowego, poszczególne etapy rozwoju kwiatów i jego części służących rozmnażaniu płciowemu, takich jak: pręciki, zalążki i ich składniki (ref. [22, 32]).

Porównanie starych ewolucyjnie poliploidów, jak *Arabidopsis*, z niedawno naturalnie powstałymi poliploidami bawełny i syntetycznymi poliploidami bawełny wykazało, że ubytek DNA lub zmiany w epigenetycznej regulacji podwojonych genów są inicjowane bezpośrednio lub wkrótce po poliploidyzacji. Skutkiem poliploidyzacji może być genowo-specyficzne lub regionalne wyciszenie genów indukowane epigenetycznie w wyniku metylacji DNA i histonów, wmontowanie sekwencji kodujących do nieaktywnej transkrypcyjnie, trwale skondensowanej heterochromatyny i aktywacja retroelementów lub działanie iRNA [41], (ref. [1, 37]). W świetle dotychczasowych danych obecnie przyjmuje się, że wyciszenie pewnych genów jest procesem sterowanym, dla innych – przypadkowym. Wyciszenie zduplikowanych genów u poliploidów jest wyjaśniane rozmaicie. Wydaje się, że istotnym mechanizmem jest zachowanie odpowiedniej dawki genów [1]. Zjawisko wyciszenia podwojonych genów jest istotnym elementem ewolucji poliploidów [1].

#### 4. UDZIAŁ SEKWENCJI POWTARZALNYCH W MODYFIKACJI ROZMIARÓW GENOMÓW

Wspomniane we Wstępie prace Flavella i jego zespołu [12, 13] wykazały wielokrotnie potwierdzalne istnienie korelacji między rozmiarami genomu i ilością sekwencji powtarzalnych. Wkrótce okazało się, że przeważająca liczba sekwencji powtarzalnych to rozmaite kategorie ruchomych elementów, które zasiedliły genomy jądrowe Eukaryota. Wśród tych elementów jedną z grup stanowią retrotranspozony długości od 700 pz do 15 kpz, oflankowane długimi powtórzeniami terminalnymi – LTR-ami (ang. *Long Terminal Repeats*, ref. [37, 40]). Ich udział w genomach roślin okrytozalążkowych jest znaczny; np. u kukurydzy stanowi aż 70% (ref. [7]). Podane poniżej dane o udziale sekwencji powtarzalnych w ewolucji rozmiarów genomów zostały ograniczone do retrotranspozonów z LTR-ami oraz do jednej grupy niekodujących sekwencji (CNS), ponieważ tym sekwencjom powtarzalnym poświęcono najwięcej uwagi w związku z ich udziałem w modyfikacji rozmiarów genomów.

##### 4.1. Retrotranspozony z długimi powtórzeniami terminalnymi (LTR)

Retrotranspozony z LTR-ami są szczególnie dogodnym obiektem badań udziału i przemian ruchomych elementów, ponieważ są one liczne i obecne we wszystkich częściach genomu jądrowego (w heterochromatynie, regionach przycentromerowych mogą znajdować się między genami lub być przez nie otoczone). Zmiany zachodzące w retrotranspozonach mogą być wykorzystane w rekonstrukcji tych elementów u gatunków ancestralnych, z których pochodzą genomy zawierające retrotranspozony z LTR-ami we współczesnych populacjach. Retrotranspozony z LTR-ami mają charakterystyczne cechy, które ułatwiają ich identyfikację i umożliwiają wykrywanie mutacji. Zmutowane retrotranspozony nie ulegają eliminacji w wyniku naturalnej selekcji. Dzięki przeprowadzeniu analizy mutacji można było stwierdzić, że u *Arabidopsis* i 6 gatunków roślin uprawnych wiek tych retroelementów wynosi ok. 3 miliony lat [7].

Zwiększenie liczby retroelementów w genomie – poza procesem poliploidyzacji – odbywa się poprzez ich amplifikację. Amplifikacja jest uwarunkowana przejściem retroelementów ze stanu nieaktywnego w aktywny i przyczynia się do zwiększenia rozmiarów genomu. Redukcja liczby retroelementów z LTR-ami następuje w wyniku delecji. Delecje te powstają w rezultacie nierównej homologicznej rekombinacji (ang. *unequal homologous recombination*), tzn. procesu, podczas którego nie w pełni wymieniane są odcinki DNA, oraz nieuprawnionej rekombinacji (ang. *illegitimate recombination*), tj. wymiany odcinków niehomologicznych. Jednym z produktów nieuprawnionej rekombinacji jest kolista retrotranspozona, który zawiera tylko jeden LTR; kolista retrotranspozona zwykle jest degradowana i usuwana z genomu (ref. [6]). U *Arabidopsis* w wyniku pojedynczej delecji może nastąpić ubytek od 10 do 3766 pz w obrębie wewnętrznej części retrotranspozona z LTR-ami. Dłuższe delecje – rzędu 1 kpz – nie są powszechne. Wydaje się zatem, że akumulacja bardzo licznych, krótkich delecji jest odpowiedzialna za fragmentację większości retrotranspozonów z LTR-ami.

U ryżu średnie rozmiary delecji były rzędu 41 i 318 pz; przyjęto, że tą drogą zostało usuniętych w ciągu minionych 5 milionów lat 190 Mpz [7]. Półokres trwania retrotranspozonów z LTR-ami u ryżu jest krótszy niż 3 miliony lat, a jeszcze dawniej został usunięty retrotranspozon z LTR-ami o długości powyżej 194 Mpz. Amplifikacja i usuwanie retroelementów trwa nadal (ref. [6], por. także rozdz. 6.).

Chociaż mechanizmy molekularne decydujące o amplifikacji lub eliminacji retrotranspozonów (szczegółowo omówione w artykule przeglądowym [7]) są w znacznej mierze poznane, dotąd nie wiadomo, dlaczego w ewolucji jednych gatunków następuje zwiększenie rozmiarów genomu poprzez zwiększenie udziału retroelementów, u innych – redukcja jego rozmiarów w wyniku delecji. Jest możliwe, że procesy te są regulowane przez czynniki środowiskowe powodujące selekcję w odpowiednim kierunku (por. rozdz. 6.).

#### 4.2. Konserwatywne niekodujące sekwencje

W modelach ewolucji genów w związku z podwajaniem genomu (poliploidyzacją) przewiduje się, że funkcjonalna dywergencja, czyli subfunkcjonalizacja zduplikowanych genów (por. rozdz. 3.) jest spowodowana przez utratę elementów regulatorowych. Domniemanymi elementami regulatorowymi są konserwatywne niekodujące sekwencje zwane CNS-ami (ang. *Conserved Non-coding Sequences*). Są to krótkie odcinki DNA zachowane między gatunkami (dlatego konserwatywne). Znajdują się one głównie powyżej regionu regulatorowego [28]. U roślin liczba CNS-ów i ich długość są znacznie mniejsze niż u ssaków, co jest związane z o wiele bardziej licznymi rundami poliploidyzacji. Kolejne podwojenia genomów stanowią okazję do powstania subfunkcjonalizacji genów, co potencjalnie powoduje utratę CNS-ów przypadających na jeden gen. O słuszności tego twierdzenia świadczy porównanie liczby rodzin genowych, tj. zawierających geny paralogiczne (pochodzące od wspólnego przodka) u roślin i zwierząt. Tylko 35% genów u *Arabidopsis* jest w pojedynczych kopiach; u człowieka takie geny stanowią aż 86%. U *Arabidopsis* ponad 37% genów należy do rodzin genowych składających się z 5 lub więcej członków; u człowieka – zaledwie 1,4% (ref. [28]).

Paradoksalnie, subfunkcjonalizacja po duplikacji może prowadzić do względnie prostych regionów regulatorowych przypadających na jeden gen. U kukurydzy i ryżu na jeden gen przypadają średnio trzy CNS-y, ale brak jest CNS-ów w 27% zbadanych genów. Geny ssaków mają średnio 17,7 CNS-ów. Długość CNS-ów w obrębie genów ortologicznych (mimo odmiennej sekwencji DNA kodujących białka o takiej samej funkcji fizjologicznej) u roślin wynosi poniżej 12 pz, przy czym żaden z poznanych dotąd nie był dłuższy niż 60 pz. U ssaków długość CNS-ów zawiera się w granicach od 60 do 100 pz (ref. [28]). Względna prostota regionów regulatorowych u roślin mogłaby odzwierciedlać różnice w złożoności zarówno samych organizmów, jak i ich rozwoju.

Przytoczone dane wskazują, że u roślin jednym z procesów przyczyniających się do zmniejszania rozmiarów genomu mogłaby być redukcja liczby i długości CNS-ów.

## 5. ZMIENNOŚĆ I EWOLUCJA GENOMÓW I ICH ROZMIARÓW WŚRÓD SPOKREWNIONYCH GATUNKÓW I RODZAJÓW

Opisane wyżej przemiany spowodowane bezpośrednio przez poliploidyzację oraz inwazję ruchomych elementów i ich modyfikacje powodują przebudowę (rearanżację) genomów, której skutkiem mogą być zmiany rozmiarów genomów, głównie w wyniku amplifikacji i delekcji ruchomych elementów (odpowiednio zwiększenie lub zmniejszenie zawartości DNA). Rośliny stanowią niezwykle dogodny obiekt do badań zmienności genomu. W porównaniu z analogicznie złożonymi organizmami, jakimi są ssaki, u roślin następują liczniejsze procesy powodujące zwiększenie, jak i zmniejszenie genomu oraz jego przebudowę [7].

Zmienność rozmiarów genomu w obrębie gatunku była wielokrotnie opisywana. Nasuwa się pytanie, czy różnice, szczególnie nieistotne statystycznie, nie są artefaktem, bowiem wyniki świadczące o takich modyfikacjach bywają kwestionowane. Stwierdzone różnice, często przypisywane odmianom uprawnym lub kojarzone z różnicami genotypowymi, mogą być spowodowane przez stosowanie niewłaściwych metod i standardów służących do oznaczania bezwzględnej zawartości C DNA. Rezultaty krytycznej analizy kilku takich wyników uzyskanych w obrębie gatunku dowodzą, że poza błędami metodycznymi stwierdzone różnice nie były istotne statystycznie [16]. Natomiast znaczne różnice (nawet blisko dwukrotne) wartości 1C DNA w grupie osobników zaliczanych do tego samego gatunku są interpretowane jako dowód przynależności tak różniących się roślin do rozmaitych podgatunków; za argument dodatkowy uważa się różnice w morfologii i preferowanych siedliskach. Postuluje się zatem, aby wewnątrzgatunkowe różnice rozmiarów genomów konfrontować z cechami morfologicznymi [33]. Przy rozważaniu różnic w zawartości C DNA należy wziąć pod uwagę różnice w warunkach środowiskowych (por. rozdz. 6.). Wydają się nie budzić wątpliwości te wyniki badań, w których wykazano związek między zwiększeniem/zmniejszeniem rozmiarów genomów a amplifikacją/ubytkiem różnego rodzaju sekwencji powtarzalnych (ref. [36]). Obecność chromosomu/ów B w istotny sposób wpływa na rozmiary genomu oraz zgodnie z teorią nukleotypową (por. niżej) powoduje wydłużenie czasu trwania cyklu komórkowego (ref. [30]).

Wyniki sekwencjonowania DNA sklonowanych w BAC fragmentów chromosomów wskazują na istnienie w niektórych chromosomach segmentalnych duplikacji i na obecność tandemowych rodzin genów [6]. Typowe rearanżacje chromosomów w toku ewolucji genomów to translokacje oraz inwersje, powodujące różnice w strukturze chromosomów u spokrewnionych taksonów, jak np. w rodzajach *Lycopersicon* (pomidor), *Solanum* (ziemniak) i *Gossypium* (bawełna). Niewiele dotąd wiadomo o związku między skutkami genotypowymi rearanżacji chromosomów i procesem specjacji [9]. Allopoliploidy, do których należą liczne gatunki uprawne, ale i dziko rosnące, są od dawna obiektem licznych badań cytogenetycznych i molekularnych. Rearanżacja genomów u allopoliploidów może następować, przynajmniej częściowo, w wyniku aktywacji retroelementów [10]. Ostatnio szczególnie dobrze zostały poznane zmiany

w genomach gatunków allopoliploidowych w porównaniu z domniemanymi gatunkami ancestralnymi z zastosowaniem metod z zakresu cytogenetyki molekularnej – GISH (ang. *Genomic In Situ Hybridization*) i FISH (ang. *Fluorescence In Situ Hybridization*).

Metoda GISH umożliwia odróżnienie u allopoliploidów chromosomów i ich fragmentów pochodzących z poszczególnych diploidalnych genomów ancestralnych. W ten sposób wykazano u niektórych gatunków allopoliploidalnych zbóż istnienie translokacji między genomami ancestralnymi (ref. [36]). W przypadku małych chromosomów u rodzaju *Brassica* istnienia tego procesu nie można było udowodnić [29]. Allotetraploidalny gatunek *Nicotiana tabacum* (tytoń,  $2n = 4x = 48$ , genom TS) powstał 5–6 milionów lat temu ze skrzyżowania dwóch gatunków diploidalnych: *N. sylvestris* ( $2n = 2x = 24$ , genom S) i *N. tomentosiformis* ( $2n = 2x = 24$ , genom T). Takie pochodzenie *N. tabacum* zostało potwierdzone przez rezultaty współczesnych krzyżówek. Wyniki GISH nie tylko pozwoliły na odróżnienie chromosomów z genomu S i T, ale również wykazały translokacje T/S i S/T [14]. Ciekawy przypadek modyfikacji chromosomów został stwierdzony u naturalnego heksaploida *Chenopodium album* (komosa biała, zwana także lebiodą,  $2n = 6x = 54$ ), u którego chromosomy są krótsze – 1,0–2,6  $\mu\text{m}$  niż u diploida ( $2n = 2x = 18$ ) – 1,4–2,7  $\mu\text{m}$ . Sonda w metodzie GISH z DNA diploidów dawała silne sygnały hybrydyzacyjne tylko u 18 chromosomów dłuższych; krótsze wykazywały znacznie słabsze sygnały [26].

U wymienionych gatunków allotetraploidalnych i u naturalnych poliploidów *Chenopodium album* przeprowadzono metodą FISH badania porównawcze z zastosowaniem jako sond 45S rDNA lub 25S rDNA oraz 5S rDNA w odniesieniu do diploidów ancestralnych bądź naturalnego diploida. U allotetraploidów *Brassica* wykazano m.in. modyfikacje liczby *loci* 5S rDNA lub 45S rDNA w porównaniu z ancestralnymi diploidami. U allotetraploidów ma miejsce bądź zmniejszenie liczby *loci* 5S rDNA (*B. juncea* – gorczyca etiopska, *B. napus* – w zależności od odmiany – rzepak lub brukiew) lub ich liczba stanowi sumę *loci* u gatunków ancestralnych (*B. carinata* – gorczyca), natomiast liczba *loci* 25S rDNA ulega bądź zmniejszeniu (*B. juncea*, *B. carinata*), bądź zwiększeniu (*B. napus*) lub nie ulega zmianom. Różnice liczby *loci* u tego samego gatunku zależą od odmiany [18, 20, 21]. Niektóre geny kodujące 45S rDNA stają się u allotetraploidów *Brassica* nieaktywne transkrypcyjnie [19]. U naturalnego allopoliploida *Arabidopsis suecica* zachodzi wyciszenie genów rRNA pochodzących z genomu jednego z diploidalnych gatunków ancestralnych – *Arabidopsis thaliana* (ref. [10]). U allotetraploida *Nicotiana tabacum* (genom ST, por. wyżej) w porównaniu z diploidami ancestralnymi (*N. sylvestris* – genom S i *N. tomentosiformis*) następuje eliminacja 45S rDNA pochodzącego z genomu S, w którym u diploida sygnał po FISH jest słabszy niż w genomie diploida z genomem T. Znaczne różnice w genomach diploidów ancestralnych dotyczą 5S rDNA. W genomach S długość jednostki powtarzalnej wynosi 431 pz, a liczba kopii – 900. W genomach T jednostka powtarzalna składa się z 644 pz i jest powtórzona 400 razy. U allotetraploida *N. tabacum* liczba kopii 5S rDNA jest zmienna w zależności od odmiany: im większa liczba kopii pochodzi z genomu S, tym mniejsza liczba kopii jest z genomu T i odwrotnie, ale zawsze liczba kopii jest większa



od sumy tych kopii u diploidów ancestralnych [14]. U wspomnianych wyżej naturalnych poliploidów *Chenopodium album* następuje wyraźna redukcja liczby *loci* kodujących rRNA. U diploida ( $2n = 18$ ) jest jedna para chromosomów z 25S rDNA i dwie pary z 5S rDNA; tetraploid ( $2n = 4x = 36$ ) ma jedną parę chromosomów z 25S rDNA i trzy pary chromosomów z *loci* 5S rDNA, u heksaploida ( $2n = 54$ ) są dwie pary chromosomów z 25S rDNA i cztery pary z 5S rDNA [26].

Poznanie rozmiarów genomów u auto- i allopoliploidów umożliwiło rozpatrywanie tej cechy genomu jako skutku poliploidyzacji. U indukowanego kolchicyną autotetraploida *Sorghum versicolor* zawartość 2C DNA – 6,67 pg – przewyższa ponad dwukrotnie (również po uwzględnieniu SE) rozmiar genomu u roślin diploidalnych – 3,25 pg [37]. U naturalnego heksaploida *Chenopodium album* ( $2n = 54$ ) w porównaniu z diploidem ( $2n = 18$ ) zawartość 2C DNA wynosi zaledwie 3,85 pg (zamiast oczekiwanego 5,4 pg) [26]. Podobnie u allotetraploida *Brassica carinata* (genom BBCC) 1C DNA wynosi 1,308 pg i jest mniejszy (także po uwzględnieniu SE) niż można oczekiwać na podstawie zsumowania diploidalnych genomów ancestralnych: *Brassica nigra* (gorczyca czarna, genom BB) – 1C DNA = 0,647 pg i *B. oleracea* (kapusta warzywna, genom CC) – 1C DNA = 0,710 pg (ref. [24]). Jedną z przyczyn redukcji rozmiarów genomu u poliploidów, stwierdzoną u *Chenopodium album*, ale niepowszechną u rodzaju *Brassica*, mógłby być ubytek genów kodujących rRNA (por. wyżej, także skrócenie części chromosomów u komosy białej).

Szczegółowe analizy ewolucji rozmiarów genomów wśród spokrewnionych gatunków były przeprowadzane z uwzględnieniem liczby i rozmiarów chromosomów przez porównanie sekwencji ITS (ang. *Internal Transcribed Sequences* – wewnętrzne, transkrybowane sekwencje w genie 45S rRNA, usytuowane u roślin między genem kodującym 18S rRNA a 5,8S rRNA oraz między 5,8 S rRNA i 25S rRNA). Na podstawie tych właściwości dla poszczególnych gatunków są konstruowane dendrogramy, z których wyciąga się wnioski o kierunku ewolucji rozmiarów genomów w obrębie badanego rodzaju. Wielu autorów jest zdania, że ewolucja zmierza ku redukcji rozmiarów genomu. Tak jest np. w obrębie rodzaju *Sorghum* [38]. Jednak w grupie spokrewnionych gatunków innych rodzajów modyfikacje rozmiarów genomów wykazują tendencję zarówno ku jego redukcji, jak i zwiększeniu. Taka sytuacja jest wśród licznych gatunków bawełny (ref. [38]) oraz w rodzinie *Brassicaceae*, w której wszystkie zbadane pod tym względem gatunki charakteryzują się małym genomem (1C od 0,2 do maksymalnie 0,710 pg u gatunków diploidalnych) [24]. Wiele gatunków należących do tej rodziny to allopoliploidy. Przyjęto, że przodek w tej rodzinie ma najmniejszy hipotetyczny genom (1C = 0,2 pg). W rodzaju *Arabidopsis*, jeśli przyjmie się jako podstawę do analizy zmian w rozmiarach genomu zawartość DNA przypadającą na 1x chromosomów (aby ominąć różnice wynikające z poliploidyzacji), następuje zwiększenie tej wartości w porównaniu z diploidalnym gatunkiem wyjściowym – *A. thaliana* [24]. Natomiast u rodzaju *Brassica* następowało zmniejszenie genomu (przykłady podane wyżej [24]).

Bennett już w 1972 r. [3] wykazał u okrytozależkowych roślin zielnych istnienie dodatniej korelacji między rozmiarami genomu a czasem trwania cyklu życiowego, cyklu komórkowego i mejozy, masą nasion, rozmiarami jądra i komórki (ta ostatnia

zależność nie zawsze była potwierdzana, por. [8]). Gatunki jednoroczne, a szczególnie efemerydy, u których cykl życiowy trwa zaledwie kilka tygodni, mają najmniejsze genomy, znacznie mniejsze niż gatunki dwu- i wieloletnie. Koncepcja Bennetta, dotycząca również wielu innych zależności cech roślin od rozmiaru genomu, została nazwana teorią nukleotypową. Jest ona stale uzupełniana przez nowe dowody świadczące o jej słuszności (por. [25]) i jest powszechnie akceptowana. Np. u australijskich gatunków *Sorghum* różnice w rozmiarach genomów między gatunkami jednorocznymi i wieloletnimi są dosyć znaczne: u jednorocznych średnia 2C wynosi 2,89 pg, u wieloletnich – 7,73 pg [37]. Wśród chwastów, szybko rosnące i rozwijające się gatunki (dlatego uważane za agresywne) mają mniejsze genomy niż spokrewnione gatunki niebędące chwastami.

Rozmiar genomu, poprzez tempo podziałów komórkowych i wielkość komórek, wpływa na morfologię liści i intensywność fotosyntezy. Stwierdzono istnienie negatywnej korelacji między rozmiarami genomu a wskaźnikiem nazwanym SLA (ang. *Specific Leaf Area*, tj. zależność między powierzchnią i masą liści). Niski SLA charakteryzuje gatunki z dużym genomem. U takich gatunków jest niższa intensywność fotosyntezy [25]. Te wyniki odzwierciedlają odpowiadającą im prawidłowość stwierdzoną u ptaków i ssaków, u których tempo metabolizmu jest negatywnie skorelowane z rozmiarami genomu (ref. [25, 43]).

Rośliny z dużymi genomami wydają się być ograniczone w procesie specjacji. W obrębie rodzaju istnieją mniej liczne gatunki niż wśród rodzajów z małym genomem. Stwierdzono nawet negatywną korelację między średnimi rozmiarami genomów a liczbą gatunków w obrębie rodzaju [42]. Ostatnio wykazano jednak, że u 761 rodzajów zbadanych pod tym względem istnieje zaledwie słaba negatywna korelacja między rozmiarami genomu a liczbą gatunków w danym rodzaju. Autorzy tych badań [25] podkreślają, że w tego typu analizach istnieje potencjalne źródło błędów, ponieważ niewiele wiadomo o rozmiarach genomu u gatunków ancestralnych oraz w obrębie rodzaju nie jest możliwe uwzględnienie wszystkich gatunków przynależnych do badanego rodzaju. Mimo tych zastrzeżeń, przyjęta jest sugestia, że w procesie specjacji duże genomy są ograniczone w ewolucji ze względu na nikłe lub bardzo wolne tempo dywersyfikacji; gatunki z bardzo dużymi genomami cechują się mniejszymi zdolnościami przystosowawczymi niż gatunki z małymi genomami [25] (por. rozdz. 6.).

Na podstawie przytoczonych danych można uznać, że skoro tempo rozwoju i czas trwania cyklu życiowego oraz zdolności przystosowawcze zależą, przynajmniej częściowo, od rozmiaru genomu, w ewolucji następuje selekcja w kierunku przyspieszenia rozwoju równoległe z redukcją rozmiarów genomów [16,25].

## 6. UDZIAŁ CZYNNIKÓW ŚRODOWISKOWYCH W MODYFIKACJI ROZMIARÓW GENOMÓW

Nawet przy bardzo krytycznej ocenie wiarygodności wyników badań dotyczących rozmiarów genomu (por. rozdz. 5.), trzeba wziąć pod uwagę wiele danych wskazujących na istnienie wewnątrzgatunkowej zmienności tej jego cechy. Modyfikacje wielkości

genomu mogą być wynikiem czynników środowiskowych, a w szczególności klimatu, w jakim rozwijają się rośliny (ref. [31]). Należy jednak zaznaczyć, że zmiany te, tj. zwiększenie/zmniejszenie rozmiarów genomu w podobnych warunkach nie zawsze zmierzają w tym samym kierunku. Badano modyfikacje wielkości genomów u tych samych gatunków w zależności od wysokości n.p.m., szerokości geograficznej i temperatury.

Negatywną korelację między wielkością genomu i wysokością n.p.m. stwierdzono w europejskich populacjach traw: *Festuca arundinacea* (kostrzewa trzciniowa), *Dactylis glomerata* (kupkówka pospolita) i uprawnych odmian *Zea mays* (kukurydza). Wyniki te są komentowane jako efekt przewagi selekcyjnej roślin z małym genomem w ekstremalnych warunkach i krótkim okresie wegetacji, jakie panują na dużych wysokościach (ref. [31]). Jednak w obrębie 23 populacji *Zea mays* uzyskano inne wyniki: rośliny ze średnimi rozmiarami genomu występują na średnich wysokościach, a gatunki z małym genomem – zarówno na poziomie morza, jak i na wysokości 2440 m (ref. [25]).

W badaniach zależności między szerokością geograficzną a wielkością genomu stwierdzono znaczne różnice rozmiarów genomu u kukurydzy w klimacie tropikalnym; odkąd kukurydza została zaadaptowana jako roślina uprawna w Ameryce Północnej, wielkość genomu stała się czynnikiem selekcyjnym, co doprowadziło do wprowadzenia do upraw wyłącznie odmian z najmniejszym genomem w najbardziej wysuniętych na północ obszarach tego kontynentu, tj. w Kanadzie (ref. [7]). Ta tendencja wydaje się mieć charakter powszechny, sugeruje się bowiem, że gatunki okrytozalążkowe z dużym genomem są stopniowo eliminowane z szerokości północnej (ref. [25]).

W rozważaniach na temat zależności między wysokością n.p.m. i szerokością geograficzną a rozmiarami genomów należy wziąć pod uwagę temperaturę. Po uwzględnieniu tego czynnika okazuje się, że gatunki z małym genomem mogą istnieć na każdej wysokości n.p.m. i szerokości geograficznej, ale gatunki z największymi genomami bywają eliminowane z warunków ekstremalnych. Ponadto stwierdzono, że gatunki z dużymi genomami nie występują w warunkach z krótkimi sezonami wegetacyjnymi [25].

Chociaż na podstawie wiedzy o roli sekwencji powtarzalnych, a szczególnie dobrze poznanych pod tym względem retrotranspozonów z LTR-ami (por. podrozdz. 4.1.) powszechnie przyjmuje się, że modyfikacje rozmiarów genomu są powodowane przez delecje (zmniejszenie rozmiaru) lub amplifikacje (zwiększenie) tych retroelementów, mało jest dotąd bezpośrednich dowodów na trafność tego poglądu w odpowiedzi roślin na warunki środowiska. U dzikiego gatunku jęczmienia *Hordeum spontaneum* wykazano trzykrotne zmniejszenie liczby kopii retrotranspozonów z LTR-ami w warunkach suszy i znacznej wysokości n.p.m.; redukcja ta przebiegała zgodnie z mechanizmami opisanymi wyżej (por. podrozdz. 4.1.) (ref. [31]).

O ograniczonej zdolności adaptacyjnej gatunków roślin z dużymi genomami świadczą wyniki badań dotyczących rozmiarów genomów u gatunków zagrożonych wyginięciem (na podstawie *World Conservation and Monitoring Centre – UNEP-WCMC*, odpowiednik Czerwonej Księgi w Polsce) wyróżniona została podgrupa gatunków zagrożonych wyginięciem w skali globalnej oraz podgrupa zagrożona w skali lokalnej. Z całej

grupy gatunków poddanych analizie wyłączono poliploidy i gatunki nie dość dobrze pod tym względem poznane. Wykazano istnienie korelacji między rozmiarami genomów a skalą zagrożenia wyginięciem. Najmniejszym genomem charakteryzują się gatunki niezagrożone, pośrednimi rozmiarami – zagrożone tylko lokalnie, natomiast gatunki z największym genomem stanowiły podgrupę zagrożonych w skali globalnej. Wśród gatunków starannie zweryfikowanych jako poliploidy, korelacja ta przedstawia się odwrotnie: poziom ploidalności jest negatywnie skorelowany z zagrożeniem wyginięciem [42].

Przytoczone wyniki sugerują, że warunki środowiskowe mogą stanowić czynniki powodujące eliminację gatunków z dużym genomem, upośledzonych pod względem zdolności adaptacyjnych, co przyczynia się do postępującej dominacji gatunków z małymi genomami. Zdolności przystosowawcze poliploidów (zapewne głównie allopoliploidów) doprowadziły do ich dominacji we współczesnej florze roślin okrytozalążkowych.

## 7. PERSPEKTYWY

Najnowsze opracowania dotyczące organizacji genomów roślin w zdecydowanej większości, co oczywiste, opierają się na szczegółowych analizach dwóch całkowicie zsekwencjonowanych genomów: *Arabidopsis thaliana* i *Oryza sativa* [39, 44]. Oba należą do grupy gatunków z małymi genomami: *Arabidopsis thaliana* – 140 Mpz, zaś *Oryza sativa* – 400 Mpz; ich rozmiary zdecydowanie odbiegają od uśrednionej wielkości genomów roślin okrytozalążkowych ocenionej na 5600 Mpz. Trudno uznać je zatem za reprezentatywne dla królestwa roślin, co nie zmienia faktu, że szereg zaobserwowanych u nich cech, takich jak segmentalne duplikacje znacznych części genomów czy wysoki poziom amplifikacji retroelementów, wydają się być zjawiskami powszechnymi wśród roślin okrytozalążkowych (por. rozdz. 2., 4.1. i 5.).

Opracowane strategie i techniki sekwencjonowania stwarzają realne szanse poznania w najbliższym czasie genomu modelowego gatunku reprezentującego grupę o dużych genomach – *Zea mays* (*Maize Genomics Project*). Genom kukurydzy jest pod względem rozmiarów (2400–2700 Mpz) zbliżony do wielkości genomów ssaków (1400–3700 Mpz), co stwarza szersze podstawy do analiz porównawczych. Już obecna wiedza o nim wskazuje na kilka charakterystycznych cech, takich jak allotetraploidalna segmentalność czy ogromna, znacznie wyższa niż u *Arabidopsis thaliana* obfitość wysoce konserwatywnych elementów powtarzalnych (ok. 80% genomu kukurydzy i poniżej 20% u rzodkiewnika), będąca efektem szczególnie intensywnych amplifikacji zachodzących w okresie ostatnich kilku milionów lat. Nawet niepełne dane o sekwencjach genomu kukurydzy dowodzą istnienia retroelementów reprezentujących setki czy nawet tysiące ich rodzin, a geny stanowią u tego gatunku małe wyspy w morzu retrotranspozonów z LTR-ami. Tego rodzaju organizacja genomu jest znacznie bliższa większości roślin okrytozalążkowych niż typ istniejący u *Arabidopsis thaliana* i *Oryza sativa*. Charakterystyka genomu kukurydzy dotyczy też m.in. rozmieszczenia 5-metylocytozyny.

Większość powtarzalnych elementów jest u tego gatunku, podobnie jak u ssaków, wysoce zmetylowana, podczas gdy geny, przeciwnie niż u ssaków, wydają się być głównie niezmetrylowane, nawet w tych tkankach, w których nie ulegają ekspresji.

Mimo iż genom kukurydzy jest 6 lub 7 razy większy niż ryżu, a blisko 20 razy większy niż rzodkiewnika, jest on znacznie mniejszy od genomów kilku ważnych gatunków uprawnych, np. jęczmienia – 5000 Mpz, pszenicy – 17000 Mpz, ale rozmiary genomu kukurydzy otwierają większe możliwości analiz porównawczych z genomami zwierzęcymi.

Nadzieje na szybkie poznanie pełnej sekwencji genomu *Zea mays* wynikają z doświadczeń wyniesionych z realizacji *Human Genome Project* i związane są z integracją kilku najbardziej efektywnych strategii i technik sekwencyjnych, jak WGS (*whole-genome shotgun*), GE (*gene-enrichment*) i BAC (*bacterial artificial chromosome clones*). Będą one następnie wykorzystane w analizach największych genomów roślinnych. Nie ulega wątpliwości, że uzyskane tą drogą informacje wypełnią liczne luki w aktualnej wiedzy na temat ewolucji rozmiarów genomów u roślin okrytozalążkowych.

## 8. WNIOSKI

Na podstawie większości dotąd uzyskanych danych można przyjąć, że ewolucja rozmiarów genomów u roślin okrytozalążkowych zmierza ku ich redukcji mimo licznych rund poliploidyzacji, jakiej ulegały one w odległej przeszłości. Na taką tendencję wskazuje szereg dowodów z biologii molekularnej, cytologii i cytogenetyki molekularnej, fizjologii oraz ekologii.

Podwojone sekwencje kodujące mogą być eliminowane, wyciszane lub ulec subfunkcjonalizacji, dzięki czemu następuje dywersyfikacja szlaków metabolicznych oraz zdolności do adaptacji.

O wielkości genomu decyduje głównie zawartość rozmaitego rodzaju sekwencji powtarzalnych. Inwazja retroelementów oraz ich liczba, długość i modyfikacje są uznawane za czynniki regulujące rozmiary genomu. Amplifikacja retroelementów powoduje zwiększenie rozmiaru genomu, zaś delecje – jego zmniejszenie. U naturalnych auto- i allopoliploidów rozmiary genomu są mniejsze niż suma wielkości genomów ancestralnych, czemu może towarzyszyć redukcja liczby *loci* kodujących rRNA.

W porównaniu z małymi genomami, największe wykazują wolne tempo dywersyfikacji i są ograniczone ewolucyjnie wskutek mniejszych zdolności przystosowawczych. Diploidalne gatunki z dużymi genomami są bardziej narażone na wyginięcie niż diploidalne gatunki z małymi genomami. Gatunki z małymi genomami mogą istnieć w środowiskach o dużej zmienności warunków klimatycznych i krańcowo niekorzystnych dla wegetacji, ponieważ charakteryzują się one krótkim cyklem życiowym i większą intensywnością fotosyntezy. W obrębie tego samego rodzaju gatunki jednoroczne i efemerydy mają mniejsze genomy niż byliny.

## LITERATURA

- [1] ADAMS KL, WENDEL JF. Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 135–141.
- [2] ADAMS KL, WENDEL JF. Novel patterns of gene expression in plants. *Trends Genet* 2005; **10**: 539–543.
- [3] BENNETT MD. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous species. *Proc R Soc London*, ser. B 1972; **181**: 109–135.
- [4] BENNETT MD, LEITCH IJ. Plant genome size research: a field in focus. *Ann Bot* 2005; **95**: 1–6.
- [5] BENNETT MD, LEITCH IJ. Nuclear DNA amounts in angiosperms: progress, problems and prospects. *Ann Bot* 2005; **95**: 45–90.
- [6] BENNETZEN JL. Transposable elements, gene creation and genome rearrangement in flowering plants. *Curr Opin Genet Develop* 2005; **15**: 621–627.
- [7] BENNETZEN JL, DEVOS KM. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Ann Bot* 2005; **95**: 127–132.
- [8] CAVALIER-SMITH T. Economy, speed and size matter: evolutionary forces driving nuclear genome miniaturization and expansion. *Ann Bot* 2005; **95**: 147–175.
- [9] COGHLAN A, EICULER EE, OLIVER SG, PATERSON AH, STEIN L. Chromosome evolution in eukaryotes: a multi-kingdom perspective. *Trends Genet* 2005; **21**: 673–682.
- [10] COMAI L. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Mol Biol* 2000; **43**: 387–399.
- [11] DOLEŽEL J, BARTOŠ J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann Bot* 2005; **95**: 99–110.
- [12] FLAVELL RB. Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Philos Trans R Soc London ser. B* 1986; **312**: 227–242.
- [13] FLAVELL RB, BENNETT MD, SMITH JB, SMITH DB. Genome size and proportion of repeated nucleotide DNA sequences in plants. *Biochem Genet* 1974; **12**: 257–269.
- [14] FULNEČEK J, LIM KY, LEITCH AR, KOVAŘIK A, MATYAŠEK R. Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species. *Heredity* 2002; **88**: 19–25.
- [15] GREGORY TR. C-value enigma in plants and animals: a review of parallels and appeal of partnership. *Ann Bot* 2005; **95**: 133–146.
- [16] GREILHUBER J. Intraspecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence. *Ann Bot* 2005; **95**: 91–98.
- [17] GREILHUBER J, DOLEŽEL J, LYSAK MA, BENNETT MD. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms “genome size” and “C-value” to describe nuclear DNA contents. *Ann Bot* 2005; **95**: 255–260.
- [18] HASTEROK R, JENKINS G, LANGDON T, JONES N, MALUSZYNSKA J. Ribosomal DNA is an effective marker of *Brassica* chromosomes. *Theor Appl Genet* 2001; **103**: 486–490.
- [19] HASTEROK R, MALUSZYNSKA J. Nucleolar dominance does not occur in root tip cells of allotetraploid *Brassica* species. *Genome* 2000; **43**: 574–579.
- [20] HASTEROK R, MALUSZYNSKA J. Cytogenetic markers of *Brassica napus* chromosomes. *J Appl Genet* 2000; **41**: 1–9.
- [21] HASTEROK R, WOLNY E, HOSIAWA M, KOWALCZYK M, KULAK-KSIAZCZYK S, KSIAZCZYK T, HENEEN W, MALUSZYNSKA J. Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of *Brassicaceae*. *Ann Bot* 2006; **97**: 205–216.
- [22] IRIS VF, LITT A. Flower development and evolution: gene duplication, diversification and redeployments. *Curr Opin Genet Develop* 2005; **15**: 454–460.
- [23] JOHNSTON JS, BENNETT MD, RAYBURN LR, GALBRAITH DW, PRICE HJ. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *Am J Bot* 1999; **86**: 609–613.
- [24] JOHNSTON JP, PEPPER AE, HALL AE, CHEN ZJ, HODNETT G, DRABEK J, LOPEZ R, PRICE HJ. Evolution of genome size in *Brassicaceae*. *Ann Bot* 2005; **95**: 229–235.
- [25] KNIGHT CA, MOLINARI NA, PETROV DA. The large genome constraint hypothesis: evaluation, ecology and phenotype. *Ann Bot* 2005; **95**: 177–190.
- [26] KOLANO B, MALUSZYNSKA J, SIWINSKA D. Molecular and cytogenetic analysis of genome structure in *Chenopodium album* complex. W: Prus-Głowacki W, Pawlaczyk EM [red.] Variability and Evolution – New Perspectives. Poznań, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Ser. Biol. Nr 72 2005: 507–517.

- [27] LEITCH IJ, SOLTIS DE, SOLTIS PS, BENNETT MD. Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta). *Ann Bot* 2005; **95**: 207–217.
- [28] LOCKTON S, GAUT BS. Plant conserved non-coding sequences and paralogue evolution. *Trends Genet* 2005; **21**: 60–65.
- [29] MAŁUSZYŃSKA J, HASTEROK R. Identification of individual chromosomes and parental genomes in *Brassica juncea* using GISH and FISH. *Cytogenet Genome Res* 2005; **109**: 310–314.
- [30] MAŁUSZYŃSKA J. Chromosom B – pasożyt czy składnik funkcjonalny genomu? *Post Biol Kom* 1994; **21**: 15–26.
- [31] MAŁUSZYŃSKA J, SIWIŃSKA D. Wielkość genomu roślinnego. *Post Biol Kom* 2004; 31, Supl. **31**: 101–114.
- [32] MOORE RC, PURUGGANAN MD. The evolutionary dynamics of plant duplicate genes. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 122–128.
- [33] MURRAY BG. When does intraspecific C-value variation become taxonomically significant? *Ann Bot* 2005; **95**: 119–125.
- [34] NOIROT M, BARRE P, LOUARN J, DUPERRAY C, HAMON S. Consequences of stoichiometric error on nuclear DNA content evaluation in *Coffea liberica* var. *dewevrei* using DAPI and propidium iodide. *Ann Bot* 2002; **89**: 385–389.
- [35] NOIROT M, BARRE P, DUPERRAY C, HAMON S, DE KOCHKO A. Investigation on the causes of stoichiometric error in genome size estimation using heat experiments: consequences on data interpretation. *Ann Bot* 2005; **95**: 111–118.
- [36] OLSZEWSKA MJ, MAŁUSZYŃSKA J. Cytogenetyka molekularna w ustalaniu cech gatunkowych i ich zmienności w analizie pokrewieństwa roślin okrytozalążkowych. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 197–218.
- [37] OLSZEWSKA MJ, MAŁUSZYŃSKA J. Budowa genomu jądrowego. W: Olszewska MJ [red.] *Podstawy cytogenetyki roślin*. wyd. II. PWN Warszawa 2005: 13–55.
- [38] PRICE HJ, DILLON SL, HODNETT G, ROONEY WL, ROSS L, JOHNSTON JS. Genome evolution in the genus *Sorghum* (*Poaceae*). *Ann Bot* 2005; **95**: 219–227.
- [39] RABINOWICZ PD, BENNETZEN JL. The maize genome as a model for efficient sequence analysis of large plant genome. *Curr Opin Plant Biol* 2006; **9**: 149–156.
- [40] SAKOWICZ T. Analiza molekularna niektórych sekwencji powtarzalnych wybranych gatunków *Vicia*. Wydawn. Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź: 2003.
- [41] WESSLER SR, CARRINGTON JC. Genome studies and molecular genetics. The consequence of gene and genome duplication in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 119–121.
- [42] VINOGRADOV AE. Selfish DNA is maladaptive: evidence from the plant Red list. *Trends Genet* 2003; **19**: 609–614.
- [43] VINOGRADOV AE. Evolution of genome size: multilevel selection, mutation bias or dynamical chaos? *Curr Opin Genet Develop* 2004; **14**: 620–626.
- [44] THE *ARABIDOPSIS* GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000; **408**: 796–815.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 04.04. 2006 r.*

*Przyjęto: 11.05. 2006 r.*

*Banacha 12/16, 90-237 Łódź*