

ELŻBIETA KUTA

Zakład Cytologii
i Embriologii Roślin
Instytutu Botaniki
Uniwersytet Jagielloński
Kraków

METODY BIOLOGII MOLEKULARNEJ W BIOSYSTEMATYCE ROŚLIN

WSTĘP

Wiele się zmieniło od wprowadzenia w roku 1943 przez C a m p a i G i l l y ' e g o [9] definicji biosystematyki. Terminem tym autorzy określali raczej wąską dziedzinę badań. Biosystematyka, czyli inaczej eksperymentalna taksonomia, w swoich początkach wykorzystywała badania kariologiczne, embriologiczne i eksperymentalne (różne typy krzyżowań międzyrodzajowych i międzygatunkowych) jako źródła dodatkowych informacji (obok morfologiczno-anatomicznych). Badania kariologiczne koncentrowały się wówczas głównie na ustalaniu liczby chromosomów, a co się z tym wiąże na określaniu poliploidów i aneuploidów. Z danych embriologicznych, szczególnie przydatne dla biosystematyki okazały się informacje dotyczące sposobu koniugacji chromosomów w mejozie oraz typów rozmnażania (głównie dotyczyło to apomiksji, czyli innego niż seksualny sposobu rozmnażania). W roku 1969 na Międzynarodowym Kongresie Botanicznym w Seattle, W a g n e r [80] podsumowując osiągnięcia biosystematyki stwierdził, iż te dodatkowe dane dotyczące poliploidów, mieszańców i innych sposobów rozmnażania to tylko tzw. „szum ewolucyjny” (evolutionary noise). Główne mechanizmy ewolucji działają na poziomie diploidalnym u organizmów rozmnażających się seksualnie.

Dzisiaj, z perspektywy ponad 20 lat, nikt nie ma wątpliwości, że współczesna taksonomia odbiega od utartego schematu dawnej klasycznej taksonomii, opierającej się głównie na cechach morfologiczno-anatomicznych, a staje się nauką korzystającą z informacji dostarczanych z różnych dziedzin biologii, począwszy od anatomii i morfologii, poprzez dane kariologiczne, embriologiczne czy wreszcie biochemiczne (tab. 1). O tym, jak zmieniły się metody badań, najlepiej świadczą referaty prezentowane na międzynarodowych sympozjach biosystematyki roślin odbywających się co trzy lata [34, 46, 79].

Najnowsze techniki badań stosowane w biosystematyce oparte są głównie na analizie DNA jądrowego (głównie rDNA) oraz DNA organelli komórkowych. Coraz większe zastosowanie w rozwiązywaniu skomplikowanych problemów natury taksonomicznej i ewolucyjnej znajduje analiza zmienności chloroplas-

Tabela 1

Cechy genomu brane pod uwagę w biosystematyce roślin (wg Granta (1987) [w:] Urbńska [79])

Cytogenetyczne	Molekularne
1. Liczba chromosomów a) gametyczna (n) b) genomowa (x) c) poliploidalna d) aneuploidalna 2. Kariotyp a) wewnątrzkomórkowe przestrzenne rozmieszczenie chromosomów b) zmienność kariotypu c) mutacje chromosomów d) B-chromosomy 3. Morfologia chromosomów a) heterochromatyna b) centromery c) przewężenia wtórne i satelity d) wzory prążkowe 4. Koniugacja chromosomów w mejozie a) frekwencja chiasm b) asynapsis-desynapsis	1. Ilość DNA (ustalona dla całego genomu, lub chromosomu) 2. Ilość unikatowych i powtarzających się sekwencji w genomie; sekwencje kodujące i niekodujące; zmienność rDNA 3. Hybrydyzacja DNA-DNA, DNA-RNA 4. Mapy restrykcyjne sekwencji DNA jądrowego i genomów organelli komórkowych

Tabela 2

Metody biologii molekularnej w biosystematyce roślin (wg Clegga i wsp. [11], zmienione)

Analiza genów/genomu	Stosowane metody
1. DNA chloroplastów (cpDNA) cpDNA geny- <i>rbcL</i>	Analiza restrykcyjna Analiza sekwencji
2. DNA mitochondriów (mtDNA)	Analiza restrykcyjna
3. rDNA- odcinki DNA kodujące rybosomalny RNA	Analiza restrykcyjna i analiza sekwencji
4. Powtarzające się sekwencje DNA a) Knob heterochromatyna b) geny CAB c) geny <i>rbcS</i>	Analiza sekwencji Analiza sekwencji Analiza sekwencji
5. Unikatowe sekwencje genów	Analiza restrykcyjna

towego DNA (cpDNA) oraz mitochondrialnego DNA (mtDNA). W ciągu ostatnich 10 lat nastąpił duży postęp w technikach badań, stwarzając możliwości porównywania nie tylko całych genomów, ale pojedynczych genów, czy nawet tylko pewnych odcinków genu (tab. 2). Zastosowanie metod biologii molekularnej pozwala na lepsze zrozumienie procesów mikroewolucyjnych, na ustalenie przyczyn zmienności roślin, wykrywanie zmienności ukrytej oraz powiązań filogenetycznych w obrębie różnych grup roślin i na różnych poziomach

taksonomicznych. Ponadto możliwość ekstrahowania i analizowania DNA pochodzącego z kopalnych szczątków roślinnych i zwierzęcych otwiera nowe perspektywy dla paleobotaniki i paleozoologii.

METODY BADAŃ I ICH ZASTOSOWANIE

A. METODA ELEKTROFOREZY ENZYMÓW (ANALIZA ZMIENNOŚCI ALLOENZYMÓW I IZOENZYMÓW)

Metody polegające na elektroforetycznym rozdziale enzymów znalazły zastosowanie głównie w badaniach populacyjnych na poziomie gatunku i podgatunku, czyli przy analizowaniu procesów mikroewolucyjnych związanych z różnymi systemami kojarzeń w populacjach, z migracjami oraz hybrydyzacją. Zastosowanie metod analizy enzymów pozwala na wykrycie lokalnego różnicowania w populacjach roślinnych oraz stwarza możliwości ustalenia jego przyczyny. Natomiast znaczenie omawianych metod jest wyraźnie mniejsze przy ustalaniu powiązań filogenetycznych na wyższych poziomach taksonomicznych. Spośród licznych prac przeglądowych dotyczących zastosowania i wykorzystania w biosystematyce roślin informacji dotyczących zmienności enzymów na podkreślenie zasługują następujące opracowania: Brown [6], Buth [8], Crawford [13], Ferguson [22], Gottlieb [28, 30, 31], Hillis [39], Hurka [42], Soltis i Soltis [70], Stoneburner i wsp. [73].

B. ANALIZA DNA

Analiza DNA dostarcza najbardziej bezpośrednich informacji genetycznych, a tym samym stwarza możliwość ustalenia ścisłego pokrewieństwa genetycznego między taksonami. Do badań biosystematycznych wykorzystuje się zarówno DNA jądrowy, jak również pozajądrowy, głównie DNA chloroplastów (cpDNA) i mitochondriów (mtDNA). Różne typy komórkowego DNA analizuje się stosując najczęściej dwie podstawowe metody: 1) analizę restrykcyjną, będącą pośrednią metodą analizy DNA, oraz 2) bezpośrednią analizę DNA z zastosowaniem metod sekwencjonowania. Obydwie metody zmierzają do zbadania nie poznanych dotąd prawidłowych sekwencji w DNA roślinnym, jak również do wykrycia różnego typu mutacji.

Analiza restrykcyjna polega na uzyskaniu fragmentów nici DNA przez zastosowanie enzymów restrykcyjnych (każdy enzym „rozpoznaje” określoną sekwencję nukleotydów w łańcuchu DNA). Uzyskane w wyniku cięcia enzymami odcinki DNA poddaje się elektroforezie na żelu agarozowym, a następnie hybrydyzacji z radioaktywnymi sondami molekularnymi wg Southerna. Analiza prążków widocznych na autoradiogramie pozwala na dokonanie porównań pomiędzy osobnikami danego gatunku czy między różnymi gatunkami.

Analiza sekwencji nukleotydów w łańcuchach DNA dostarcza najbardziej precyzyjnych informacji dotyczących zmian zachodzących w DNA w toku

ewolucji. Najnowsze techniki badań pozwalają na sekwencjonowanie pojedynczych genów czy nawet fragmentów genu. Powszechnie dzisiaj stosowana metoda enzymatycznej amplifikacji (powielania) *in vitro* genów (PCR — Polymereze Chain Reaction) pozwala na bardzo szybkie powielanie pojedynczych wybranych genów (stosując tę metodę omija się długi proces klonowania). W reakcji tej, z użyciem syntetycznych oligonukleotydowych primerów komplementarnych do sekwencji flankujących wybrany odcinek DNA oraz polimerazy DNA, następuje szybka synteza kilkuset tysięcy kopii danej sekwencji. Produkty reakcji mogą być następnie analizowane metodami elektroforezy w żelach, trawienia enzymami restrykcyjnymi lub bezpośredniego sekwencjonowania. Metoda ta znalazła szerokie zastosowanie w genetyce człowieka, a otwiera również nowe możliwości dla badań biosystematycznych [11]. Pozytywne rezultaty uzyskano stosując technikę PCR do amplifikacji fragmentów DNA pochodzącego z kopalnych szczątków roślin i zwierząt. Stosunkowo niedawno dokonano amplifikacji genów z tkanek zwierzęcych pochodzących sprzed 4—13 tysięcy lat [60]. Sukcesem zakończyły się również badania nad chloroplastowym DNA (amplifikacji poddano gen *rbcL* kodujący dużą podjednostkę karboksylazy rybulozo-1,5-dwufosforanowej) wyizolowanym z mioceńskich szczątków kopalnych liścia *Magnolia latahensis* [26]. Porównanie kopalnych szczątków *Magnolia* z materiałem pochodzącym z kilku obecnie żyjących spokrewnionych taksonów: *Magnolia macrophylla*, *Liriodendron tulipifera* i *Persea americanum* wykazało duże pokrewieństwo materiału kopalnego z pozostałymi przedstawicielami *Magnoliidae*.

1. DNA jądrowy

a) satelitarny DNA.

Satelitarny DNA jest stałym elementem genomu roślin, zwierząt i człowieka. Odcinki satelitarnego DNA zbudowane są z wielokrotnie powtarzających się sekwencji nukleotydów i są zlokalizowane w heterochromatynie okołocentromerowej, rzadziej w telomerach. Satelitarny DNA nie jest transkrybowany *in vivo*, a jego ilość może się wahać od 1—60% (najczęściej kilka %) ogólnej wielkości genomu i stanowi charakterystyczną cechę danego organizmu. Metody biologii molekularnej (klonowanie, sekwencjonowanie), pozwalają na wydzielenie i analizę powtarzających się sekwencji w genomie roślin.

b) rDNA

U większości organizmów geny kodujące rybosomalny RNA występują w wielokrotnych kopiach w formie długich sekwencji tandemowych zlokalizowanych w jednym lub w kilku loci chromosomu. Tworzą one obszar organizatora jąderkowego (NOR). Odcinki DNA kodujące rRNA spotykane są również w mitochondrialnym DNA oraz w chloroplastowym DNA, a geny w nich

zawarte są najczęściej wykorzystywane do badań filogenetycznych. Analiza restrykcyjna, jak również sekwencjonowanie odcinków rDNA, wykazały różne tempo ewolucji poszczególnych jego rejonów. Odcinki nietranskrybowane, oddzielające rejony kodujące, mają tendencję do stosunkowo szybkich zmian mutacyjnych, natomiast rejony kodujące są bardziej konserwatywne. Tak więc zmienność wewnątrzpopulacyjną, czy powiązania między blisko spokrewnionymi gatunkami można wykryć analizując niekodujące rejony rDNA, natomiast w celu konstruowania filogenezy na wyższych poziomach taksonomicznych należy raczej porównywać wolniej ewoluujące, kodujące fragmenty rDNA [11, 45, 47, 66].

2. DNA pozajądrowy

a) DNA chloroplastów (cpDNA)

U większości roślin okrytonasiennych genom ten wykazuje dziedziczenie maceczne, natomiast u nagozalążkowych jest wprowadzany przez organizm ojcowski; istnieje również pewna grupa roślin nasiennych, u których obydwa osobniki rodzicielskie wnoszą cpDNA. Chloroplastowy DNA jest łatwy do izolacji, klonowania i ustalania sekwencji, jest wysoce konserwatywny, czyli ma ogromne znaczenie przy ustalaniu powiązań filogenetycznych na wyższych poziomach taksonomicznych [11, 56, 59, 71].

b) DNA mitochondriów (mtDNA)

Rośliny wyższe mają największy genom mtDNA spośród wszystkich organizmów eukariotycznych; na przykład mtDNA *Cucumis melo* jest około 100 razy większy od mtDNA człowieka [11, 14, 67]. Ponieważ stwierdzono, że geny zawarte w mtDNA ewoluują w różnym tempie, zastosowanie tego typu DNA w badaniach ewolucyjnych jest stosunkowo szerokie i teoretycznie można wykorzystywać metody analizy mtDNA do rozwiązywania większości problemów filogenetycznych. Badania mitochondrialnego DNA są jeszcze słabo wykorzystywane w biosystematyce roślin [14, 67], natomiast znalazły już szerokie zastosowanie dla świata zwierzęcego. Podobnie jak w przypadku chloroplastowego DNA, u większości roślin okrytonasiennych mtDNA jest przekazywany linią żeńską (dziedziczenie maceczne) [14, 53]. Specyficzny typ dziedziczenia mitochondrialnego i chloroplastowego DNA stwarza dodatkowe możliwości dla genetyki populacyjnej, dotyczy to szczególnie roślin charakteryzujących się dziedziczeniem macecznym mtDNA, zaś ojcowskim cpDNA (niektóre nagozalążkowe). W takim przypadku możliwe jest oddzielne analizowanie przepływu genów ojcowskich i matczyńskich w badanych populacjach roślinnych [14].

I. Zastosowanie analizy cpDNA i rDNA do potwierdzania mieszańców oraz introgresji

Zjawisko hybrydyzacji występuje w świecie roślin z dużą częstotliwością i w przeciwieństwie do świata zwierząt odgrywa kluczową rolę w ewolucji. Hybrydyzacja jest jednym z mechanizmów wprowadzających zmienność w populacjach roślinnych, a w wielu przypadkach (pośrednio, lub bezpośrednio) może prowadzić do specjacji [33]. Znane są różne sposoby stabilizacji mieszańców w świecie roślin. Jednym z najczęściej spotykanych jest zwielokrotnienie liczby chromosomów sterylne mieszańca, czyli powstawanie allopoliploidów. Znane są również inne typy specjacji, u których podstaw leży hybrydyzacja, ale stabilizacja mieszańców przebiega bez zwielokrotnienia liczby chromosomów. Należy tu tzw. specjacja rekombinacyjna (recombinational speciation), specjacja mieszańcowa z wytworzeniem barier zewnętrznych (hybrid speciation with external barriers) oraz tzw. permanentna heterozygotyczność translokacyjna (permanent translocation heterozygosity), której najlepszym przykładem jest rodzaj *Oenothera*. Szczegółowy opis różnych modeli specjacji podaje Grant [33].

Spośród wyżej wymienionych typów specjacji w świecie roślin, powstawanie allopoliploidów odgrywa największą rolę w ewolucji, na co wskazuje wysoki procent poliploidów (głównie allopoliploidów, czy auto-allopoliploidów) w różnych grupach roślin. Według szacunkowych danych z lat osiemdziesiątych około 70–80% roślin dwuliściennych i prawie tyle samo wśród jednoliściennych stanowią poliploidy (*sensu lato*) [50].

Powstające w przyrodzie mieszańce mogą być rozpoznawane z zastosowaniem różnych metod. Należy jednak zdawać sobie sprawę z tego, że wiele innych procesów zachodzących w populacjach roślinnych daje efekty morfologiczne podobne do hybrydyzacji. Toteż opieranie się wyłącznie na analizie cech morfologiczno-anatomicznych może prowadzić do błędnych wniosków. Heiser [38] dokonał rewizji szeregu przykładów hybrydyzacji i introgresji zwracając uwagę na wiele zjawisk, które mogą być interpretowane jako przykłady introgresji, chociaż z tym procesem nie mają nic wspólnego. Spośród najważniejszych procesów mogących wywołać efekt „pozornej hybrydyzacji” Heiser [38] wymienia następujące:

1. Obecność cech dwóch gatunków u danego osobnika niekoniecznie musi świadczyć, iż jest on mieszańcem. Może to natomiast wynikać stąd, że osobniki o cechach pośrednich są pozostałością populacji ancestralnej, z której wywodziły się oba gatunki.

2. Intergradacja pierwotna (primary intergradation) — w przypadku gatunków o szerokim zasięgu, występujących na obszarach zróżnicowanych pod względem geograficznym i ekologicznym, tworzy się stopniowa zmienność. U jej podstaw leżą zmiany genetyczne, ale nie hybrydyzacja.

3. Mutacje mogą dawać efekt podobny do introgresji. Mutacja gatunku A może być tego typu, iż mutant będzie w pewnych cechach podobny do gatunku B.

4. Segregacja u gatunków allopoliploidalnych. Segreganty mogą być podobne do jednego lub drugiego gatunku rodzicielskiego biorącego udział w powstaniu formy allopoliploidalnej.

5. Zmienność obserwowana niekiedy w populacjach roślin autogamicznych może być błędnie tłumaczona jako efekt introgresji, a jest ona najczęściej jedynie wynikiem sporadycznie występującej hybrydyzacji między osobnikami z reguły autogamicznymi. Powstała w ten sposób zmienność jest utrwalona na drodze autogamii i w konsekwencji może wystąpić selekcja pewnych typów.

6. Niekiedy tzw. rój mieszańców (hybrid swarm) jest mylnie interpretowany jako efekt introgresji. Oczywiście w takim roju mieszańców są osobniki pokolenia F_1 , dalsze pokolenia mieszańców, jak również osobniki powstałe w wyniku krzyżówek wstecznych z jednym lub z obydwojema formami rodzicielskimi. Te typy jednak nie są uważane za formy introgresywne, gdyż w myśl definicji A n d e r s o n a [1] introgresja to powtarzające się krzyżówki wsteczne.

Z powyższych rozważań wyraźnie wynika, że w wielu przypadkach do stwierdzenia mieszańcowego charakteru form, potwierdzenia zjawiska introgresji czy allopoliploidalnego pochodzenia gatunków nie wystarczają metody analizy morfologiczno-anatomicznej, czy nawet kariologicznej, ale niezbędne jest wyszukanie precyzyjnych markerów genetycznych. Tego typu informacji dostarczają badania chemiczne, a w szczególności analiza zmienności enzymów oraz DNA i to zarówno jądrowego (rDNA), jak również DNA organelli komórkowych (mtDNA i cpDNA).

Tak więc do potwierdzania mieszańcowości i introgresji zaczęto stosować, obok metod opierających się wyłącznie na analizie cech morfologiczno-anatomicznych, również metody chemiczne. Badano zarówno wtórne metabolity (np. terpenoidy) [23, 24], jak również białka, głównie enzymy [15, 35, 36, 48, 61, 62, 72, 86], oraz DNA jądrowy (rDNA) i chloroplastowy (cpDNA) [2, 4, 16, 20, 21, 47, 56, 58, 63, 64, 71, 85]. Obiektem tych badań były często rodzaje uznane niegdyś za klasyczne przykłady introgresji, np. rodzaj *Juniperus*, *Helianthus* czy *Iris* (informacji dotyczących tych klasycznych badań prowadzonych odpowiednio przez Fassetta, Heisera i Rileya dostarcza G r a n t [33].) Podano również wiele nowych przykładów z różnych grup roślin, począwszy od mszaków poprzez nago- i okrytozalążkowe. W wielu przypadkach badania te nie potwierdziły występowania introgresji, czy nawet hybrydyzacji. Tak było na przykład w przypadku dwóch północnoamerykańskich gatunków z rodzaju *Juniperus*: *Juniperus virginiana* i *J. ashei*. W populacjach tych gatunków, przy zastosowaniu analizy terpenoidów [23], nie wykazano nie tylko obecności form introgresywnych, ale nawet osobników pokolenia F_1 . Brak dowodów na występowanie hybrydyzacji między tymi gatunkami sugeruje, że obserwowana zmienność jest raczej wynikiem radiacji adaptacyjnej. Natomiast analiza terpenoidów przeprowadzona w populacjach *J. virginiana* i *J. scopulorum* [24] potwierdziła występowanie introgresji będącej przyczyną zmienności obser-

wowanej w populacjach tych gatunków. Zastosowanie metod opartych na analizie enzymów oraz różnych typów DNA pozwoliło na weryfikację dalszych przykładów introgresji. Klasycznym przykładem introgresji, cytowanym od lat niemal we wszystkich podręcznikach dotyczących specjacji w świecie roślin, jest rodzaj *Helianthus*. Badania nad jego przedstawicielami z Ameryki Północnej były prowadzone przez H e i s e r a w latach 1947–1965 (zob. G r a n t [33]). Autor stwierdził, iż gatunki z obrębu rodzaju *Helianthus* krzyżują się łatwo w przyrodzie i chociaż powstałe mieszańce wykazują bardzo obniżoną płodność, to jednak istnieje możliwość krzyżowań wstecznych, prowadzących w efekcie do powstawania form introgresywnych. Najczęściej opisywane były przykłady populacji dwóch gatunków: *Helianthus annuus* i *H. bolanderi*. W obrębie *Helianthus bolanderi* zostały wyróżnione dwie rasy: typu „chwast” oraz „serpentykowa”. H e i s e r na podstawie badań morfologicznych i cytologicznych wysunął hipotezę, że rasa typu „chwast” powstała przez stopniowe wprowadzanie genów *H. annuus* do rasy „serpentykowej”, czyli jest wynikiem introgresji. Hipotezy tej nie potwierdziły badania oparte zarówno na analizie enzymów, jak również cpDNA i rDNA [64]. Obecnie przypuszcza się, że rasa typu „chwast” wyróżniona w obrębie *H. bolanderi* nie powstała przy udziale introgresji, ale na drodze izolacji edaficznej czy geograficznej pewnych populacji rasy „serpentykowej”. Ograniczenie wymiany genów pomiędzy tymi populacjami a populacją wyjściową mogło przyczynić się do powstania nowej rasy. Badania te wykazały również, że rasa typu „chwast” powstała stosunkowo dawno, a nie w ciągu ostatnich kilku setek lat, co sugerował H e i s e r. Na stare jej pochodzenie wskazuje wysoce zróżnicowany genom cpDNA w porównaniu z cpDNA rasy „serpentykowej” i *H. annuus*.

Natomiast stosując analizę rDNA potwierdzono występowanie naturalnej hybrydyzacji i introgresji w parapatrycznych populacjach (populacje których zasięgi kontaktują się, ale nie zachodzą na siebie, krzyżowanie między nimi zdarza się bardzo rzadko) dwóch gatunków *Iris* z terenów Ameryki Północnej (Louisiana) [2]. Dotyczy to innego z klasycznych przykładów introgresji pomiędzy *Iris fulva* i *I. hexagona* (*I. hexagona* var. *gigantii-caerulea*) [1, 33].

Metody biologii molekularnej okazały się również bardzo użyteczne przy potwierdzeniu hipotezy o istnieniu w przyrodzie wspomnianej wyżej specjacji rekombinacyjnej (recombinational speciation). G r a n t [33] szeroko dyskutował możliwość występowania w przyrodzie specjacji rekombinacyjnej, przytaczając szereg wcześniejszych przykładów eksperymentalnego zsyntetyzowania nowych tzw. „mieszańcowych” gatunków w rodzajach *Gilia*, *Nicotiana*, *Elymus* i *Crepis*, oddzielonych silnymi barierami genetycznymi od gatunków wyjściowych. Analiza zmienności enzymów oraz rDNA i cpDNA potwierdziła mieszańcowe pochodzenie (na drodze specjacji rekombinacyjnej) niektórych gatunków np. *Stephanomeria diegensis* [25] czy *Helianthus paradoxus*, gatunku powstałego przy udziale *H. annuus* i *H. petiolaris* [63]. Obecnie, mając możliwość precyzyjnego potwierdzenia mieszańcowego pochodzenia gatunków, niewątpli-

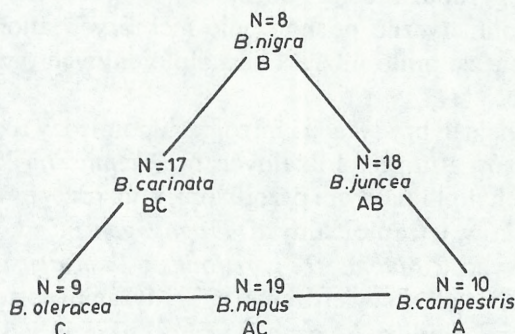
wie zmieni się dotychczasowy pogląd (oparty raczej na rozważaniach teoretycznych) na znaczenie specjacji rekombinacyjnej i częstotliwość jej występowania w populacjach roślinnych.

II. Metody biologii molekularnej (analiza cpDNA, rDNA oraz enzymów) w badaniach nad ewolucją autopoliplloidów i allopoliplloidów

Wprowadzenie metod biologii molekularnej (analiza enzymów oraz różnych typów DNA) do biosystematyki roślin dało możliwość wyjaśnienia związków w obrębie nawet najbardziej skomplikowanych kompleksów poliploidalnych. Zastosowanie metod analizy chloroplastowego DNA (cpDNA), a w szczególności połączonych metod badania chloroplastowego DNA (cpDNA) oraz pewnych odcinków jądrowego DNA (rDNA) rozpoczyna nową erę w badaniach nad ewolucją poliplloidów. A prawdziwą rewolucję poglądów dotyczących poliploidalności zapowiadają zaskakujące wyniki analiz izoenzymów niektórych paprotników i okrytonasiennych, określanych na podstawie liczby chromosomów mianem wysokich poliplloidów.

1. Zastosowanie metod analizy cpDNA i rDNA

Badania nad zastosowaniem DNA chloroplastów (cpDNA) w biosystematyce roślin rozpoczęły się w latach osiemdziesiątych i jedne z pierwszych dotyczyły właśnie poliplloidów, a mianowicie allopoliploidalnego kompleksu *Brassica* [21, 58]. Podobnie analiza jądrowego DNA (rDNA) okazała się niezwykle przydatna w ustalaniu pochodzenia i ewolucji poliplloidów. Z wcześniejszych, na uwagę zasługują prace dotyczące badań nad *Brassica napus* [58], nad poliploidalnym kompleksem *Claytonia* [18], nad rodzajem *Tolmiea* [20] czy *Zea* [87].



Rys. 1. Hipotetyczny model pochodzenia trzech amfidiploidalnych gatunków *Brassica* od trzech diploidów (wg P a l m e r [56], oparte na badaniach cytogenetycznych z roku 1935)

Analiza chloroplastowego DNA i jądrowego DNA (rDNA) dostarczyła w wielu przypadkach jednoznacznych odpowiedzi na pytania dotyczące powstawania i dalszego różnicowania się kompleksów poliploidalnych. Wyniki

tych badań podsumowane w przeglądowej pracy S o l t i s i S o l t i s [71] pozwoliły między innymi:

1. Ustalić gatunki rodzicielskie w przypadku allopoliploidów (a przy zastosowaniu cpDNA gatunek matczyny). Przykładem takich badań są prace dotyczące: *Gossypium*, *Brassica*, *Cofea*, allopoliploidalnych gatunków *Aegilops* i *Triticum*, dwóch tetraploidalnych gatunków *Tragopogon* (*T. mirus* i *T. miscellus*), tetraploidalnego cytotypu paproci *Polystichum californicum*, czy heksaploidalnego gatunku *Draba lactea*. Natomiast w przypadku autopoliploidów, badania chemiczne pozwalają potwierdzić ich pochodzenie od konkretnego gatunku diploidalnego; np. z rodziny *Saxifragaceae* przykładem mogą być tetraploidalne cytotypy *Heuchera micrantha* i *Tolmiea menziesii*.

2. Potwierdzić wielokrotne powstawanie poliploidów na danym terenie, a nawet bardziej precyzyjnie, ile razy powstały aktualnie występujące poliploidy. Dotyczy to poliploidów z obrębu różnych grup roślin, zarówno mchów, paproci, jak i roślin kwiatowych. Odpowiedzi na to pytanie dostarczają szczegółowe badania nad takimi gatunkami allopoliploidalnymi, jak: *Tragopogon mirus* i *T. miscellus*, *Draba lactea*, *Glycine tabacina*, *Asplenium*, *Hemionitis palmata*, *Pteris cretica*, *Plagiomnium medium* oraz nad autopoliploidalnymi cytotypami *Heuchera micrantha* i *Tolmiea menziesii*. Badania te wykazały w wielu przypadkach wielokrotne powstawanie poliploidów. Szczególne znaczenie ma ten fakt w przypadku autopoliploidów, gdyż może zmienić powszechnie uznawany pogląd, że autopoliploidy powstają bardzo rzadko w przyrodzie i nie odgrywają znaczącej roli w ewolucji. Już w 1980 roku L e w i s [50] sugerował wprowadzenie pojęcia tzw. autopoliploidów heterozygotycznych, czyli poliploidów powstałych przy udziale różniących się genetycznie osobników danego gatunku. U podstaw powstawania tych form leży wewnątrzgatunkowa hybrydyzacja. Ten typ autopoliploidów występuje stosunkowo często w różnych grupach roślin i odgrywa ważną rolę w ewolucji i specjacji.

3. Stwierdzić polifiletyczne pochodzenie niektórych allopoliploidów, czyli ustalić czy w ich genezie brało udział kilku diploidalnych przodków z różnych stref geograficznych.

4. Badać frekwencję hybrydyzacji i introgresji pomiędzy różnymi cytotypami w obrębie kompleksów autopoliploidalnych, np. *Tolmiea menziesii*, oraz między allopoliploidami i ich diploidalnymi przodkami, knp. przepływ genów pomiędzy populacjami gatunków tetraploidalnych *Tragopogon mirus*, *T. miscellus* oraz gatunkami diploidalnymi *T. dubius*, *T. porrifolius* i *T. pratensis*.

5. Ustalić (w przypadku stwierdzenia hybrydyzacji i introgresji) jak częsty jest przepływ genów cytoplazmatycznych w stosunku do jądrowych.

6. Stwierdzić (przy zastosowaniu cpDNA), który z gatunków diploidalnych biorących udział w powstawaniu mieszańców czy allopoliploidów jest organizmem matczynym, a który dostarczającym pyłku. W badaniach nad genezą allotetraploidalnych gatunków *Tragopogon* wysunięto hipotezę, że diploidy występujące rzadko są z reguły organizmami matczynymi, natomiast diploidy występujące powszechnie stanowią rośliny ojcowskie.

2. Zastosowanie metod elektroforetycznych — analiza izoenzymów (izozymów)

Metody analizy izoenzymów znalazły zastosowanie przy potwierdzaniu poliploidalnego pochodzenia roślin o wysokich liczbach chromosomów.

Gottlieb [28, 29, 30] w swoich pracach dotyczących stosowania metody elektroforezy izoenzymów u roślin podał kilka fundamentalnych założeń, które zostały uznane za podstawę do dalszych rozważań. Założenia te można sformułować następująco:

1. Wiele enzymów u roślin ma izoenzymy, ponieważ ta sama reakcja katalityczna występuje w kilku strukturach komórkowych, najczęściej w plastydach i mitochondriach. Minimalna liczba izoenzymów jest wartością stałą. Stała jest również ich lokalizacja w strukturach komórkowych.

2. Podwyższenie liczby izoenzymów u gatunków diploidalnych jest wynikiem duplikacji strukturalnych loci genu, czyli wynikiem duplikacji odcinków DNA odpowiedzialnych za kodowanie białek.

3. Powyższenie liczby izoenzymów u gatunków poliploidalnych jest wynikiem obecności genomów zawierających homeologiczne loci. Dotyczy to oczywiście allopoliploidów, powstających na drodze hybrydyzacji i zwielokrotnienia liczby chromosomów poprzez fuzję niezredukowanych gamet lub jednej gamety, czyli połączenia genomów niosących homeologiczne loci. Podwyższenie liczby izoenzymów na skutek poliploidyzacji jest o wiele większe niż w przypadku duplikacji pojawiającej się u diploidów.

Na przedstawionych wyżej założeniach oparto się przy próbach weryfikacji poglądów na temat poliploidalnego pochodzenia niektórych paprotników [37, 68, 83] oraz z obrębu roślin okrytonasiennych, przedstawicieli rodzin: *Asteraceae* [27], *Bromeliaceae* [69] i *Orchidaceae* [10].

Spośród paprotników obiektami badań były niektóre gatunki skrzypów [68] oraz paproci jednakozarodnikowych [37, 83]. Wcześniejsze, klasyczne badania kariologiczne wykazały, iż wszystkie gatunki skrzypów mają $2n = 216$, co przy założeniu $x = 9-11$ [51] dla tej grupy, wskazuje iż one mogą być uznane za wysokie poliploidy. Natomiast wyniki analizy izoenzymów [68] przeprowadzone dla trzech gatunków: *Equisetum arvense*, *E. laevigatum* i *E. telmateia* wykazały, że w przypadku prawie wszystkich analizowanych enzymów liczba izoenzymów była typowa dla gatunków diploidalnych *Gymnospermae* i *Angiospermae*.

Dla paproci jednakozarodnikowych podawano również wysokie liczby chromosomów ($2n = \text{ok. } 20-70$) i na tej podstawie (przyjmując $x = 9-11$) uznano, iż ponad 95% w tej grupie stanowią wysokie poliploidy [51, 51]. Podobnie jak w przypadku skrzypów, badania izoenzymów niektórych gatunków paproci jednakozarodnikowych nie potwierdziły poliploidalnego pochodzenia analizowanych osobników. Wykazały natomiast, że mimo wysokich liczb chromosomów, gatunki te są diploidami genetycznymi [37, 83].

Na podstawie powyższych informacji można wysunąć trzy zasadnicze hipotezy:

1. Wysoka liczba chromosomów u skrzypów i paproci jest wynikiem powtarzających się w dalekiej przeszłości przypadków powstawania allopoliploidów. Uzyskany w toku analizy wzór izoenzymów, typowy dla diploidów, sugeruje, że gatunki te można teoretycznie uznać za diploidy lub allopoliploidy, u których nastąpiło „wyciszenie” (silencing) prawie wszystkich zwielokrotnionych genów (duplicated genes) w ciągu długiego okresu od momentu ich powstania.

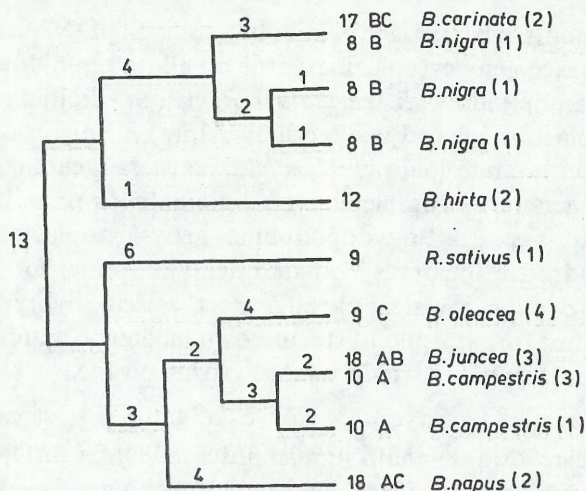
2. Gatunki te są diploidami, ponieważ trudno przyjąć hipotezę, że nastąpiło „wyciszenie” wszystkich zwielokrotnionych loci w tak różnych ewolucyjnie grupach roślin.

3. Można również teoretycznie założyć, że gatunki te są autopoliploidami młodego wieku, czyli, że loci izoenzymów zostały zwielokrotnione bez zróżnicowania. Jednak genetyczną konsekwencją autopoliploidalności jest dziedziczenie tetrasomiczne. Badane osobniki wykazują natomiast typowe dziedziczenie disomiczne. Również przy założeniu, że na drodze autopoliploidalności organizmy mogą osiągnąć najwyżej poziom tetraploidalny, hipotezę tę można odrzucić.

Podobne wyniki uzyskano w badaniach nad niektórymi roślinami kwiatowymi. W obrębie *Orchidaceae*, w podtrybie *Oncidiinae* dużemu zróżnicowaniu kariologicznemu, od $2n = 10$ do $2n = 60$ nie towarzyszy podwyższenie liczby izoenzymów, co sugeruje, iż wysokie liczby chromosomów w tej grupie nie powstały w wyniku procesu poliploidyzacji [10]. Stosunkowo wysokie liczby chromosomów ($2n = 50$) ustalone dla większości przedstawicieli *Bromeliaceae*, są również związane z typową dla diploidalnych *Angiospermae* liczbą enzymów [69]. Podobnie badania przeprowadzone nad gatunkami z rodzajów *Aster* i *Machaeranthera* (*Compositae*) [27] nie potwierdziły poliploidalnego pochodzenia cytotypów o $2n = 18$. Liczba izozymów u tych gatunków była taka sama jak u gatunków o somatycznej liczbie chromosomów $2n = 8$ i $2n = 10$, co sugeruje uznanie wszystkich wyróżnionych cytotypów za genetyczne diploidy. Powyższe przykłady mogą zmienić zasadniczo starsze koncepcje dotyczące frekwencji i znaczenia poliploidów w świecie roślin. Zwracają one również uwagę na niebezpieczeństwo wyciągania wniosków natury ewolucyjnej na podstawie danych dotyczących jedynie liczb chromosomów.

III. Zastosowanie metod analizy cpDNA do ustalania pochodzenia roślin uprawnych i ich związków z domniemanymi dzikimi przodkami

Zmienność cpDNA badano w wielu grupach zawierających gatunki roślin uprawnych. Obiektami intensywnych badań były rodzaje: *Lycopersicon-Solanum*, *Nicotiana*, *Triticum-Aegilops*, *Brassica-Raphanus*, *Coffea*, *Zea*, *Pisum*, *Linum* i *Gossypium* (zob. prace przeglądowe [56, 59, 71]).



Rys. 2. Drzewo ewolucyjne ośmiu uprawnych gatunków *Brassica* i *Raphanus* oparte na analizie restrykcyjnej cpDNA. Liczby na odgałęzieniach wskazują liczbę zaszłych mutacji punktowych. Liczby na końcu odgałęzień wskazują liczbę chromosomów, za nimi są oznaczenia literowe genomów. Liczby w nawiasach wskazują liczbę badanych powtórzeń (wg Palmer i wsp. [59])

Badania nad uprawianą bawełną (*Gossypium*) i jej pochodzeniem odegrały ważną rolę w historii cytogenetyki roślin i teorii specjacji. Według jednej z nowszych klasyfikacji taksonomicznych (Fryxell 1979) w obrębie tego rodzaju wyróżniono 42 gatunki, w tym 36 diploidów i 6 tetraploidów. Pionierskie prace nad pochodzeniem uprawnych tetraploidalnych form *Gossypium barbadense* ($2n=4x=52$) i *G. hirsutum* ($2n=4x=52$) prowadzone były już w latach trzydziestych i czterdziestych. Wyniki tych badań wskazywały, iż tetraploidy z obrębu Nowego Świata są allopolloidami zawierającymi genom A, pochodzący od diploidalnych gatunków Starego Świata i genom D, podobny do genomu diploidów Nowego Świata. Gatunki tetraploidalne *Gossypium* mają szeroki zasięg i są wysoce heterogeniczne, co sugeruje, że prawdopodobnie powstawały wielokrotnie i są bardzo starymi formami. Wiek ich szacowano na około 100 milionów lat., czyli na okres kredy, kiedy to obydwa kontynenty Ameryka i Afryka były jeszcze połączone. Wyniki analizy cpDNA [82] potwierdziły pochodzenie genomu chloroplastów od diploidalnych przodków Starego Świata. Natomiast niski stopień zróżnicowania cpDNA u gatunków tetraploidalnych zmienił nieco koncepcję ich tworzenia się na środkowy plejstocen, czyli na około 2 miliony lat temu.

Analiza zmienności cpDNA okazała się bardzo przydatna w badaniach nad ewolucją tak dobrze, wydawałoby się, opracowanego poliploidalnego kompleksu *Brassica* [21, 58]. W obrębie tego kompleksu występują gatunki diploidalne: *B. nigra* ($n = 8$ — genom B), *B. oleracea* ($n = 9$ — genom C), *Brassica campestris* ($n = 10$ — genom A) oraz amfiploidy: *B. carinata* ($n = 17$ — genomy BC), *B. napus* ($n = 9$ — genomy AC), *B. juncea*

($n = 18$ — genomy AB) (rys. 1). Wyniki badań nad cpDNA wskazały gatunki matczyne, wnoszące geny cytoplazmatyczne do allotetraploidów. I tak, w przypadku dwóch amfiploidów: *B. carinata* i *B. juncea*, diploidami wnoszącymi genom chloroplastów okazały się odpowiednio *B. nigra* i *B. campestris*. Natomiast trzeci z amfiploidów, *B. napus*, zawiera genom chloroplastów różniący się od genomów domniemanych diploidalnych przodków: *B. oleracea* i *B. campestris* (rys. 2). Prawdopodobnie geny cytoplazmatyczne zostały przekazane na drodze introgresji od niezidentyfikowanej formy diploidalnej. Badania te pozwoliły również określić czas zajścia hybrydyzacji. Na ich podstawie ustalono, iż nastąpiło to stosunkowo niedawno, natomiast wyjściowe formy rodzicielskie były już wtedy wysoce zróżnicowane.

IV. Zastosowanie analizy zmienności cpDNA i mtDNA do ustalania powiązań filogenetycznych na różnych poziomach taksonomicznych

1. Badanie zmienności wewnątrzgatunkowej

Analiza zmienności cpDNA i mtDNA ma ograniczone zastosowanie w przypadku badania wewnątrzgatunkowego zróżnicowania genetycznego. Wynika to z faktu, iż molekula cpDNA, jak również pewne odcinki mtDNA ewoluują bardzo wolno (zob. opracowania przeglądowe: [11, 14, 56, 59, 67]). Potwierdziły to badania populacyjne z zastosowaniem analizy cpDNA nad *Lupinus texensis* [3] oraz nad dwoma gatunkami sosny [81]. W przypadku *Lupinus texensis* spośród 100 analizowanych osobników pochodzących z 21 populacji w Teksasie, 88 roślin wykazywało identyczny genom chloroplastów. Dla badań populacyjnych, jak również do ustalania związków na poziomie gatunku, największe zastosowanie znalazła analiza enzymów (allozymy i izozymy).

2. Badanie zmienności międzygatunkowej

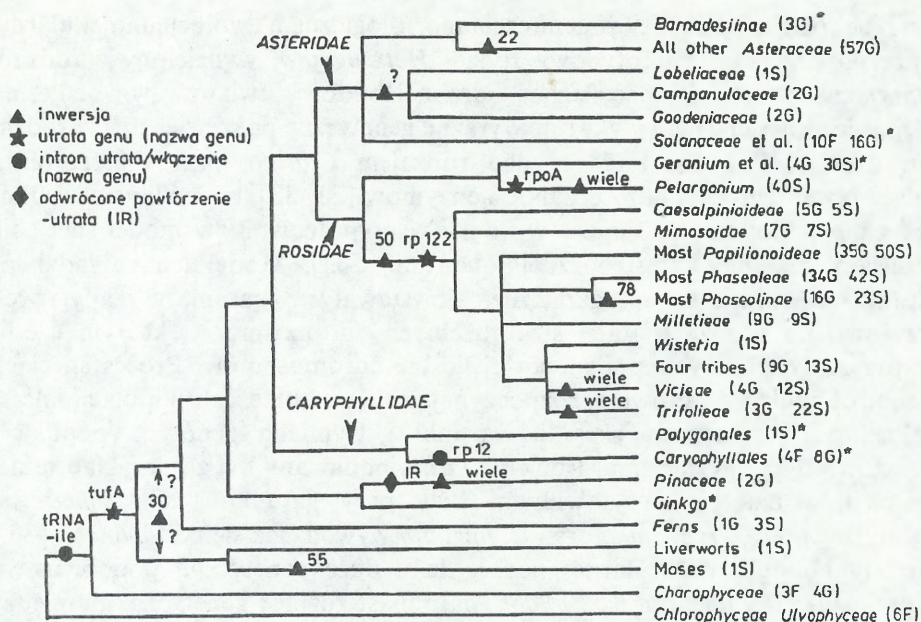
Metody biologii molekularnej (głównie analiza cpDNA i mtDNA) znalazły natomiast duże zastosowanie przy ustalaniu powiązań filogenetycznych między gatunkami w obrębie rodzaju. Do roku 1988 pojawiło się ponad 40 prac dotyczących zastosowania głównie metody analizy cpDNA do rozwiązywania problemów taksonomicznych na poziomie rodzaju (większość z nich jest cytowana w pracach przeglądowych np.: [56, 59, 67]). Wiele opracowań dotyczy rodzajów zawierających rośliny uprawne, np. *Nicotiana*, *Triticum* i *Aegilops* czy *Brassica* (zagadnienie to zostało szerzej omówione w rozdziale dotyczącym pochodzenia roślin uprawnych). Spośród prac odnoszących się do roślin dziko rosnących na podkreślenie zasługują opracowania takich rodzajów, jak: *Lisiant-hius* [77], *Clarkia* [32, 75] i *Heterogaura* [76]. Szczegółowe badania obejmujące analizę cpDNA gatunków z obrębu rodzajów *Clarkia* i *Heterogaura*, wykazały

wyraźne różnice pomiędzy zmiennością morfologiczną a ewolucją molekularną. I tak na przykład, monotypowy rodzaj *Heterogaura*, wydzielony z rodzaju *Clarkia* na podstawie specyficznej, odrębnej budowy kwiatów i owoców, na poziomie molekularnym wykazuje wyraźne genetyczne pokrewieństwo z rodzajem *Clarkia*. Ponadto badania nad rodzajem *Clarkia*, przy zastosowaniu połączonych metod analizy cpDNA i enzymów [31, 32], pozwoliły zweryfikować zaproponowany przez L e w i s a i współpracowników model specjacji, określany mianem katastroficznej (quantum) [33]. Model ten zakładał, że gatunki jednoroczne, autogamiczne, powstawały z gatunków zapylanych krzyżowo na drodze mutacji strukturalnych chromosomów, którym często towarzyszyły zmiany w podstawowej liczbie chromosomów. Proces specjacji zachodził nagle i gwałtownie, rozpoczynając się na obrzeżach populacji ances-tralnej, gdzie panowały skrajne warunki i wymiana genów z populacją wyjściową była ograniczona. Rodzaj *Clarkia* podawany był za przykład takiej specjacji, a najczęściej cytowanymi były pary gatunków: *C. franciscana* pochodząca od *C. rubicunda* oraz *C. linguata* wywodząca się od *C. biloba* [33]. Metody biologii molekularnej potwierdziły duże genetyczne podobieństwo w przypadku *C. linguata* i *C. biloba*, natomiast różnice genetyczne pomiędzy *C. franciscana* i *C. rubicunda* okazały się na tyle duże, że trudno było przyjąć ten model specjacji i raczej należało uznać *C. franciscana* za relik, a nie za formę powstałą w niedalekiej przeszłości na drodze specjacji katastroficznej [32].

W następnych latach w wielu laboratoriach głównie amerykańskich i aust-ralijskich, podejmowano badania z zastosowaniem metody analizy cpDNA, a niekiedy połączonych metod, z uwzględnieniem analizy mtDNA, a nawet DNA jądrowego w przypadku trudnych taksonomicznie grup roślin. Należy tutaj wymienić chociażby prace nad powiązaniem filogenetycznymi w obrębie rodzaju *Pinus* [74], nad skomplikowanym pod względem cytogenetycznym rodzajem *Symphytum* [65], czy *Glycine* [19].

3. Badanie powiązań filogenetycznych w obrębie rodzin i na wyższych poziomach taksonomicznych

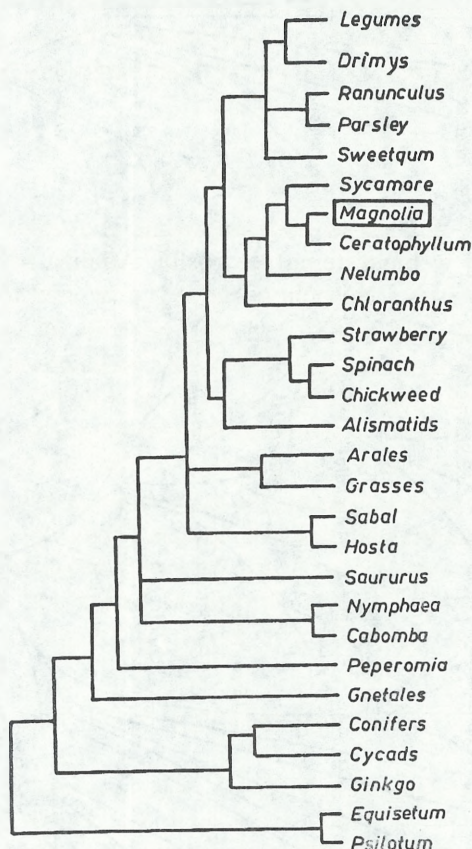
Metody biologii molekularnej okazały się bardzo pomocne przy rekon-struowaniu filogenezy na wyższych poziomach taksonomicznych, np. między rodzajami w obrębie rodzin, gdzie wzajemne powiązania są jeszcze bardzo słabo poznane. W ostatnich latach pojawiło się coraz więcej takich prac, co wskazuje na skuteczność stosowania metod biologii molekularnej w tej dziedzinie badań. Z wcześniejszych należy wymienić fragmentaryczne prace nad *Asteraceae* [43, 44], *Orchidaceae* [59], *Onagraceae* [78], *Fabaceae* [7, 57], *Solanaceae* [59], czy *Poaceae* [40]. Jedne z ostatnich dotyczą rodzin: *Leguminosae* [49], *Gramineae* [17, 41] i *Rubiaceae* [5]. Bardzo nieliczne są prace dotyczące związków między rodzinami, szczególnie blisko spokrewnionymi rodzinami. Do takich należy jedno z ostatnich opracowań nad filogenezą podklasy *Asteridae* [54].



Rys. 3. Drzewo ewolucyjne oparte na rozmieszczeniu wybranych zmian mutacyjnych cpDNA. Nie wszystkie znane mutacje są przedstawione. Gwiazdki oznaczają genomy o układzie genów zgodnym z układem genów roślin naczyniowych. Liczby w nawiasach wskazują liczby badanych taksonów (F — rodzina; G — rodzaj; S — gatunek). Znaki zapytania wskazują zmiany niepewnego pochodzenia (wg P a l m e r [56])

Na podstawie informacji dostarczonych dzięki zastosowaniu metod biologii molekularnej, a dotyczących zmienności samego DNA na różnych poziomach taksonomicznych, dokonano rekonstrukcji drzewa ewolucyjnego całego świata roślin [55, 59]. Próbowano ustalić pokrewieństwa genetyczne w obrębie rodzin, pomiędzy rodzinami czy nawet jeszcze szerzej, pomiędzy roślinami wyższymi z jednej strony a glonami z drugiej (rys. 3). W pewnych przypadkach wyniki dostarczone przez stosowanie tych metod odbiegają od dotychczasowych i zmieniają nieco spojrzenie na niektóre powszechnie przyjęte hipotezy dotyczące np. czasu powstania roślin kwiatowych, wydzielenia się jedno- i dwuliściennych, czy pozycji filogenetycznej rzędu *Magnoliales* [47, 52, 84]. I tak na przykład, wyniki analizy pewnych sekwencji cpDNA oraz genu kodującego enzym dehydrogenazę 3-fosforanową aldehydu glicerolowego (GAPDH) przedstawiciele różnych grup roślin kwiatowych [47, 52, 84] wyraźnie wskazują na wcześniejsze pojawienie się roślin kwiatowych niż ustalono na podstawie badań szczątków kopalnych, umiejscawiających wydzielenie się *Angiospermae* w kredzie [12]. Wyniki analiz DNA sugerują pojawienie się pierwszych przedstawicieli roślin kwiatowych już 200 mln lat temu [47], a nawet jeszcze wcześniej, bo ok. 320 mln lat temu czyli w karbonie [52] (około 150 mln lat wcześniej niż na to wskazują szczątki kopalne). Badania te skłaniają również do przyjęcia hipotezy wcześniejszego zróżnicowania *Angiospermae* na jedno- i dwuliścienne, co mogło

nastąpić już w karbonie. Tym samym wydzielenie się *Magnoliidae* i dalszych 4 wyższych podklas dwuliściennych musiało nastąpić nieco później, prawdopodobnie w permie. Dane oparte na analizie zmian mutacyjnych w DNA zmieniają zasadniczo obraz tradycyjnego drzewa filogenetycznego roślin kwiatowych



Rys. 5. Drzewo ewolucyjne roślin kwiatowych oparte na analizie sekwencji rDNA 46 taksonów. Rodzaje włączone w każdą kategorię; 1) Rośliny strączkowe (*Legumes*) — *Glycyne*, *Pisum*; 2) Żabieńcowate (*Alismatids*) — *Sagittaria*, *Potamogeton*, *Echinodorus*; 3) Obrazkowate (*Arales*) — *Colocasia*, *Pistia*; 4) Trawy (*Grasses*) — *Zea*, *Tripsacum*, *Sorghum*, *Saccharum*, *Oryza*, *Avena*, *Hordeum*, *Triticum*, *Arundinaria*; 5) Gnietowce (*Genetales*) — *Gnetum*, *Welwitschia*, *Ephedra* (wg K n a k a i wsp. [47]).

wych wykreślonego np. na podstawie klasyfikacji T a k h t a j a n a z 1966 roku. Podstawą dendrogramów był niezmiennie rząd *Magnoliales* uznany powszechnie za początek radiacji roślin kwiatowych (rys. 4, 5).

Wyniki uzyskane z zastosowaniem metod biologii molekularnej są uznawane za kontroweryjne, budziły i budzą ciągle szereg wątpliwości. Zarzuty dotyczą głównie faktu, że zegr molekularny opiera się na przeliczaniu tempa zmian mutacyjnych (przy założeniu stałego tempa mutacji) w różnych typach DNA

osobników obecnie żyjących. Do tej pory, aby wnikać w daleką przeszłość, opierano się na danych molekularnych pochodzących z analizy współczesnych osobników i odnoszono je do przeszłości. Była to więc niejako droga pośrednia. Rozstrzygnięcie wątpliwości i istniejących sporów może dostarczyć analiza DNA szczątków kopalnych, czyli ewentualna możliwość skalibrowania tempa mutacji. W przypadku materiału roślinnego szczegółowych danych dotyczących DNA szczątków kopalnych sprzed ok. 20 ml lat dostarczyła praca G o l e n b e r g a i wsp. [26].

PODSUMOWANIE

W pracy niniejszej dokonano podsumowania znaczenia stosowania metod biologii molekularnej w biosystematyce roślin. Analiza różnych typów DNA (jądrowy, chloroplastowy i mitochondrialny), a w niektórych przypadkach również enzymów (allozymów i izozymów), okazała się niezwykle przydatna w rozwiązywaniu szeregu skomplikowanych problemów taksonomicznych, filogenetycznych i ewolucyjnych. Zastosowanie analizy enzymów jest ograniczone do badań populacyjnych i ustalania zmienności na poziomie gatunku. Metody te są niezwykle przydatne do badania procesów mikroewolucyjnych, takich jak systemy kojarzeń, migracje, lokalne zróżnicowanie populacji i hybrydyzacja. Natomiast analiza zmienności różnych typów DNA ma ogromne znaczenie w badaniach filogenetycznych na wyższych poziomach hierarchii taksonomicznej, dostarczyła również nowych danych w badaniach nad pochodzeniem i ewolucją poliploidów oraz nad hybrydyzacją i introgresją.

LITERATURA

1. A n d e r s o n E. — *Introgressive hybridization*. J. Wiley and Sons, London—New York 1949.
2. A r n o l d M. L., B e n n e t t B. D., Z i m m e r E. — *Natural hybridization between *Iris fulva* and *Iris hexagona*; pattern of ribosomal DNA variation*. Evolution 44: 1512—1521, 1990.
3. B a n k s J. A., B i r k y C. W., Jr. — *Chloroplast DNA diversity is low in a wild plant *Lupinus texensis**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 6950—6954, 1985.
4. B e c k s t r o m - S t e r n b e r g S. M., R i e s e b e r g L. H., D o a n K. — *Gene lineage analysis in populations of *Helianthus niveus* and *H. petiolaris* (Asteraceae)*. Pl. Syst. Evol. 175: 125—138, 1991.
5. B r e m e r B. — *Restriction data from chloroplast DNA for phylogenetic reconstruction: is there only accurate way of scoring?* Pl. Syst. Evol. 175: 39—54, 1991.
6. B r t o w n A. H. D. — *The role of isozyme studies in molecular systematics*. Austr. Syst. Bot. 3: 39—46, 1990.
7. B r u n e a u A., D o y l e J. J., P a l m e r J. D. — *A chloroplast DNA inversion as a subtribal character in the tribe Phaseoleae (Leguminosae: Papilionoideae)*. Amer. J. Bot. 75: 162, 1988.
8. B u t h D. G. — *The application of electrophoretic data in systematic studies*. Ann. Rev. Ecol. Syust. 15: 501—522, 1984.
9. C a m p W. H., G i l l y C. L. — *The structure and origin of species*. Brittonia 4: 323—385, 1943.
10. C h a s e M. W., O l m s t e a d R. G. — *Isozyme number in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae): an evaluation of polyploidy*. Amer. J. Bot. 75: 1080—1085, 1988.

11. Clegg M.T., Durbin M.L. — *Molecular approaches to the study of plant biosystematics*. Austr. Syst. Bot. 3: 1—8, 1990.
12. Crane P.R., Donoghue M.J., Doyle J., Friis E.M. — *Angiosperm origin*. Nature 342: 131—132, 1989.
13. Crawford D.J. — *Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies [w:] Isozymes in Plant Genetics and Breeding*. S.O. Tanksley, T.J. Orton (red.), Elsevier, Amsterdam, 1983.
13. Crawford D.J. — *Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies [w:] Isozymes in Plant Genetics and Breeding*. S.O. Tanksley, T.J. Orton (red.), Elsevier, Amsterdam, 1983.
14. Crozier R. H. — *From population genetics to phylogeny: uses and limits of mitochondrial DNA*. Austr. Syst. Bot. 3: 111—124, 1990.
15. DePamphilis C. W., Wyatt R. — *Electrophoretic confirmation of interspecific hybridization in Aesculus (Hypocastanaceae) and the genetic structure of a broad hybrid zone*. Evolution 44: 1295—1317, 1990.
16. Doebley J. — *Molecular evidence for a missing wild relative of maize and the introgression of its chloroplast genome into Zea perennis*. Evolution 43: 1555—1559, 1989.
17. Doebley J., Durbin M., Golenberg E. — *Evolutionary analysis of the large subunit of carboxylase (rbcL) nucleotide sequence among the grasses (Gramineae)*. Evolution 44: 1097—1108, 1990.
18. Doyle J. J., Beachy R. N., Lewis W. H. — *Evolution of rDNA in Claytonia polyploid complexes*. [w:] *Plant Biosystematics*. W.F. Grant, (red.), Academic Press, London: 321—341, 1984.
19. Doyle J.J., Doyle J.L., Brown A. H. D. — *A chloroplast — DNA phylogeny of the wild perennial relatives of soybean (Glycine subgenus Glycine): congruence with morphological and crossing groups*. Evolution 4: 371—389, 1990.
20. Doyle J.J., Soltis D.E., Soltis P.S. — *An intergeneric hybrid in the Saxifragaceae: Evidence from ribosomal RNA genes*. Amer. J. Bot. 72: 1388—1391, 1985.
21. Erickson L. R., Straus N. A., Beversdorf W. — *Restriction patterns reveal origins of chloroplast genomes in Brassica amphiploids*. Theor. Appl. Genet. 65: 201—206, 1983.
22. Ferguson A. — *Isozyme studies and their interpretation*. [w:] *Prospects in Systematics*. D.L. Hawkesworth (red.) Clarendon, Oxford: 184—201, 1988.
23. Flake R. H., von Rudloff E., Turner B. L. — *Quantitative study of clinal variation in Juniperus virginiana using terpenoid data*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 64: 487—494, 1969.
24. Flake R.H., Urbatsch L., Turner B. L. — *Chemical documentation of allopatric introgression in Juniperus*. Syst. Bot. 3: 129—144, 1978.
25. Gallez G. P., Gottlieb L. D. — *Genetic evidence for the hybrid origin of the diploid plant Stephanomeria diegensis*. Evolution 36: 1158—1167, 1982..
26. Golenberg E. M., Giannasi D. E., Clegg M. T., Smiley Ch. J., Durbin M., Henderson D., Zurawski G. — *Chloroplast DNA sequence from a Miocene Magnolia species*. Nature 344: 656—658, 1990.
27. Gottlieb L. D. — *Gene numbers in species of Asteraceae that have different chromosome numbers*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3726—3729, 1981.
28. Gottlieb L. D. — *Electrophoretic evidence and plant populations*. Progr. Phytochem, 7: 1—46, 1981.
29. Gottlieb L. D. — *Conservation and duplication of isozymes in plants*. Science 216: 373—380, 1982.
30. Gottlieb L. D. — *Isozyme number and phylogeny*. [w:] *Proteins and Nucleic Acids in Plant systematics*. U. Jensen, D. E. Fairbrothers (red.), Springer-Verlag, Berlin, 209—221, 1983.

31. G o t t l i e b L. D. — *Isozyme evidence and problem solving in plant systematics*. [w:] *Plant Biosystematics*. W. F. G r a n t (red.) Academic Press, Toronto, Orlando, San Diego, New York, London, Montreal, San Francisco, Sydney, Tokyo, Sao Paulo: 343—357, 1984.
32. G o t t l i e b L. D. — *Genetic differentiation, speciation and phylogeny in Clarkia (Onagraceae)*. [w:] *Modern aspects of species*. — K. I w a t s u k i, P. H. R a v e n, W. J. B o c k (red.), University of Tokyo Press, Tokyo: 145—160, 1986.
33. G r a n t V. — *Plant speciation*. Columbia University Press, New York, 1981.
34. G r a n t W. F. (red.) — *Plant Biosystematics*. Academic Press, Toronto, Orlando, San Diego, New York, London, Montreal, San Francisco, Sydney, Tokyo, Sao Paulo 1984.
35. H a m a k e r J. M., S n y d e r E. B. — *Electrophoretic patterns of needle enzymes in long leaf and sonderegger pines*. US Forest Serv. Res. Note 152: 1—8, 1973.
36. H a s e R. C., S w i t z e r G. L. — *Introgression with short-leaf pinemy explain rust resistance in western loblolly pine*. US Forest Serv. Note: 50—88, 1969.
37. H a u f l e r Ch., S o l t i s D. E. — *Genetic evidence suggests that homosporous ferns with high chromosome numbers are diploid*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4389—4393, 1986.
38. H e i s e r C. B. — *Introgression re-examined*. Bot. Rev. 39: 347—366, 1973.
39. H i l l i s D. M. — *Molecular versus morphological approaches to systematics*. Ann. Rev. Ecol. Syst. 18: 23—42, 1987.
40. H i l u K. W. — *Chloroplast DNA in the systematics and evolution of the Poaceae*. [w:] *Grass Systematics and Evolution*. T. R. S o d e r s t r o m, K. W. H i l u, C. S. C a m p b e l l, M. E. B a r k w o r t h (red.), Smithsonian Press, Washington: 67—72, 1987.
41. H i l u K. W., J o h n s o n J. L. (1991) *Chloroplast DNA reassociation and grass phylogeny*. Pl. Syst. Evol. 176: 21—31, 1991.
42. H u r k a H. — *Enzymes as a taxonomic tool: a botanists view*. [w:] *Principles and Practice*. F. A. B i s b y, J. G. V a u g h a m, G. A. W r i g h t (red.), Academic Press, London: 103—121, 1980.
43. J a n s e n R. K., P a l m e r J. D. — *A chloroplast DNA inversion marks an ancient evolutionary split in the sunflower family (Asteraceae)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 5818—5822, 1987.
44. J a n s e n R. K., P a l m e r J. D. — *Phylogenetic implications of chloroplast DNA restriction site variation in the Mutisieae (Asteraceae)*. Amer. J. Bot. 75: 751—764, 1988.
45. J o r g e n s e n R. A., C l u s t e r P. D. — *Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies*. Ann. Missouri Bot. Gard. 75: 1238—1247, 1988.
46. K a w a n o S. (red.) — *Biological Approaches and Evolutionary Trends in Plants*. Academic Press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto 1990.
47. K n a a k Ch., H a m b y K., A r n o l d M. L., L e b l a n c M. D., C h a p m a n R. L., Z i m m e r E. A. — *Ribosomal DNA variation and its use in plant biosystematics*. [w:] *Biological Approaches and Evolutionary Trends in Plants*. S. K a w a n o (red.), Academic Press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto 1990.
48. L a n g e v i n S. A., C l a y K., G r a c e J. B. — *The incidence and effects of hybridization between cultivated rice and its related weed red rice (Oryza sativa L.)*. Evolution 14: 1000—1008, 1990.
49. L a v i n M., D o y l e J. J., P a l m e r J. D. — *Evolutionary significance of the loss of the chloroplast-DNA inverted repeat in the Leguminosae subfamily Papilionoideae*. Evolution 44: 390—402, 1990.
50. L e w i s H. — *Polyploidy in species populations*. [w:] *Polyploidy Biological Relevance*. W. H. L e w i s (red.), Plenum Press, New York, London: 103—143, 1980.
51. L o e v e A., L o e v e D., P i c h i - S e r m o l l i R. E. G. — *Cytotaxonomical Atlas of the Pteridophyta*. Cramer, Vaduz.
52. M a r t i n W., G i e r l A., S a e d l e r H. — *Molecular evidence for pre-Cretaceous angiosperm origins*. Nature 339: 46—48, 1977.

53. M o g e n s e n H. L. — *Exclusion of male mitochondria and plastids during syngamy in barley as a basis of maternal inheritance*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 2594—2597, 1988.
54. O l m s t e a d R. G., J a n s e n R. K., M i c h a e l i s H. J., D o w n i e S. R., P a l m e r J. D. — *Chloroplast DNA and Phylogenetic Studies in the Asteridae*. [w:] *Biological Approache and Evolutionary Trends in Plants*. S. K a w a n o (red.), Academic Press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto: 119—144, 1990.
55. P a l m e r J. D. — *Evolution of chloroplast and mitochondrial DNA in plants and algae*. [w:] *Monographs in Evolutionary Biology: Molecular Evolutionary Genetics*. R.J. M a c I n t y r e (red.), Plenum Press, New York: 131—240, 1985.
56. P a l m e r J. D. — *Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation*. Amer. Nat. 130: S6—S29, 1987.
57. P a l m e r J. D., O s o r i o B., A l d r i c h J., T h o m p s o n W. F. — *Chloroplast DNA evolution among legumes: Loss of a large inverted repeat occured prior to other sequences rearrangement*. Curr. Genet. 11: 275—286, 1987.
58. P a l m e r J. D., S h i e l d s C. R., C o h e n D. B., O r t o n T. J. — *Chloroplast DNA evolution and the origin of amphiploid Brassica*. Theor. Appl. Genet. 65: 181—189, 1983.
59. P a l m e r J. D., J a n s e n R. K., M i c h a e l s H. J., C h a s e M. W., M a n h a r t J. R. — *Chloroplast DNA variation and plant phylogeny*. Ann. Missouri Bot. Gard. 75: 1180—1206, 1988.
60. P ä ä b o S. — *Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1939—1943, 1989.
61. P h i l l i p s M. A., B r o w n A. H. D. — *Mating system and hybridity in Eucalyptus pauciflora*. Austr. J. Biol. Sci. 30: 337—344, 1977.
62. P r u s - G ł o w a c k i W. — *Serological investigation of hybrid swarm population of Pinus sylvestris L. x Pinus mugo Turra, and the antigenetic differentiation of Pinus sylvestris L. in Sweden*. [w] *Proteins and Nucleic Acids in Plant Systematics*. U. Jansen, D.E. Fairbrothers (red.), Springer-Verlag, Berlin: 352—361, 1983.
63. R i e s e b e r g L. H., C a r t e r R., Z o n a S. — *Molecular tests of the hypothesizes hybrid origin of two diploid Helianthus species (Asteraceae)*. Evolution 44: 1498—1511, 1990.
64. R i e s e b e r g L. H., S o l t i s D. E., P a l m e r J. D. — *A molecular reexamination of introgression between Helianthus annuus and H. bolanderi (Compositae)*. Evolution 42: 227—238, 1988.
65. S a n d b r i n g J. M., v a n B r e d e r o d e J., G a d e l l a T. W. J. — *Phylogenetic relationships in the genus Symphytum (Boraginaceae)*. Proc. Kon. Akad. v. Wetensch. 93: 295—333, 1990.
66. S h a a l B. A., L e a r n G. H., Jr. — *Ribosomal DNA variation within and among plant populations*. Ann. Missouri Bot. Gard. 75: 1207—1216, 1988.
67. S e d e r o f f R. R. — *Molecular mechanisms of mitochondrial—genome evolution in higher plants*. Amer. Nat. 130: 530—545, 1987.
68. S o l t i s D. E. — *Genetic evidence for diploidy in Equisetum*. Amer. J. Bot. 73: 908—913, 1986.
69. S o l t i s D. E., G i l m a r t i n A. J., R e i s e b e r g L., G a r d n e r S. — *Genetic variation in the epiphytes Tillandsia ionantha and T. recurvata (Bromeliaceae)*. Amer. J. Bot. 73: 531—537, 1987.
70. S o l t i s D. E., S o l t i s P. S. (red.) — *Isoenzymes in Plant Biology*. Dioscorides Press 1989.
71. S o l t i s D. E., S o l t i s P. S. — *Chloroplast DNA and Nuclear rDNA Variaton: Insights into Autopolyploid and Allopolyploid Evolution* [w:] *Biological Approaches and Evolutionary Trends in Plants*. S. K a w a n o (red.), Academic Press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto: 97—117, 1990.
72. S t e i n b r u c k G., S c h l e g e l M., D a h l s t r o m I., R o t t g e r B. — *Characterization of interspecific hybrids between Orchis mascula and O. pallens by enzyme electrophoresis*. Pl. Syst. Evol. 153: 229—241, 1986.

73. Stoneburner A., Wyatt R. and Odrzykoski I. — *Application of enzyme electrophoresis to Bryophyte Systematics and Population Biology*. Advances in Bryology 4: 1—27, 1991.
74. Strauss S. H., Doerksen A. H. — *Restriction fragment analysis of pine phylogeny*. Evolution 14: 1081—1096, 1990.
75. Sysma K. J., Gottlieb L. D. — *Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in Clarkia sect. Peripetas (Onagraceae)*. Evolution 40: 1248—1261, 1986.
76. Sysma K. J., Gottlieb L. D. — *Chloroplast DNA evidence for the origin of the genus Heterogaura from a species of Clarkia (Onagraceae)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5554—5557, 1986.
77. Sysma K. J., Schaal B. A. — *Phylogenetics of the Lisianthus skinneri (Gentianaceae) species complex in Panama utilizing DNA restriction fragment analysis*. Evolution 39: 594—608, 1985.
78. Sysma K. J., Smith J. F. — *DNA and morphology: comparisons in the Onagraceae*. Ann. Missouri Bot. Gard. 75: 1217—1237, 1988.
79. Urbánska K. (red.) — *Differentiation Patterns in Higher Plants*. Academic Press 1987.
80. Wagner W. H., Jr. — *Biosystematics and evolutionary noise*. Taxon 19: 146—151, 1970.
81. Wagner D. B., Furnir G. R., Saghai-Maroof M. A., Williams S. M., Dancik B. P., Allard R. W. — *Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 2097—2100, 1987.
82. Wendel W. — *New world tetraploid cottons contain Old World cytoplasm*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 4132—4136, 1989.
83. Wolf P. G., Hauffler C. H., Sheffield E. — *Electrophoretic Evidence for Genetic Diploidy in the Bracken Fern (Pteridium aquilinum)*. Science 236: 947—949, 1987.
84. Wolfie K. H., Gouy M., Yang Y-W., Sharp P. M., Li W-H — *Date of monocot-dicot divergence estimated from chloroplast DNA sequence data*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 9045—9058, 1989.
85. Wyatt R., Odrzykoski I. J., Stoneburner A., Bass H. W., Galau G. A. — *Allopolyploidy in bryophytes: Multiple origins of Plagiomnium medium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 5601—5604, 1988.
86. Zieliński R. — *An electrophoretic and Cytological study of hybridization between Aconitum napellus ssp. skerisorae ($2n = 32$) and A. variegatum ($2n = 16$). I. Electrophoretic evidence*. Acta Soc. Bot. Pol. 51: 453—464, 1982.
87. Zimmer E. A., Juppe E. R., Walbot V. — *Ribosomal gene structure, variation and inheritance in maize and its ancestors*. Genetics 120: 1125—1136, 1988.