

ZASTOSOWANIE GENOMOWEJ HYBRYDYZACJI *in situ* W BADANIACH GENETYCZNYCH MIESZAŃCÓW ODDALONYCH KOMPLEKSU *Lolium-Festuca*

Agnieszka Leśniewska-Bocianowska, Arkadiusz Kosmala, Maria Skibińska,
Zbigniew Zwierzykowski

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Wstęp

Gatunki z rodzajów *Lolium* L. i *Festuca* L., w tym: *L. multiflorum* LAM. (życica wielokwiatowa), *L. perenne* L. (życica trwała), *F. pratensis* HUDS. (kostrzewa łąkowa) i *F. arundinacea* SCHREB. (kostrzewa trzciniowa), należą do grupy najważniejszych traw pastewnych. Życice charakteryzują się wysoką jakością paszy, natomiast kostrzewy trwałością i tolerancją na stresy abiotyczne i biotyczne. Mieszzańce międzyrodzajowe *Lolium* × *Festuca* łączą w swoich genotypach cechy gatunków rodzicielskich. Połączenie komplementarnych cech obu rodzajów możliwe jest poprzez amfiploidyzację (połączenie całych genomów) bądź introgresję (przeniesienie genów z jednego gatunku do drugiego).

Mieszzańce *Lolium* × *Festuca* stanowią niezwykle interesujący materiał roślinny do badań genetycznych i cytogenetycznych, są też z powodzeniem wykorzystywane w programach hodowlanych. Poznanie struktury genomowej mieszańców i ich form pochodnych to jedna z najważniejszych analiz cytogenetycznych. Aby to było możliwe potrzebne jest odpowiednie narzędzie – precyzyjna i powtarzalna metoda badawcza. W badaniach cytogenetycznych mieszańców oddalonych zbóż szeroko stosowaną i efektywną metodą jest barwienie różnicowe chromosomów. U mieszańców oddalonych traw pastewnych, a zwłaszcza traw kompleksu *Lolium-Festuca*, metoda ta nie daje jednak zadowalających wyników. W piśmiennictwie światowym można znaleźć niewiele prac traktujących o barwieniu różnicowym chromosomów traw pastewnych, w tym tylko dwie prace odnoszące się do gatunków *Lolium* i *Festuca* [THOMAS 1977, 1981]. Dlatego też do połowy lat 90-tych ubiegłego wieku w badaniach cytogenetycznych mieszańców *Lolium-Festuca* napotymano na duże trudności. Przełom nastąpił gdy możliwe stało się zastosowanie hybrydyzacji kwasów nukleinowych *in situ* (ISH, ang. *in situ* hybridization) – metody z pogranicza cytogenetyki i biologii molekularnej. Ogólna zasada ISH polega na łączeniu znakowanego jednoniciowego polinukleotydu (DNA lub RNA) zwanego sondą, z komplementarnymi sekwencjami kwasów nukleinowych w komórce. Metoda ta pozwala na fizyczną lokalizację sekwencji DNA na chro-

mosomach mitotycznych i mejotycznych, a także w jądrach interfazowych bezpośrednio na preparatach cytologicznych. Najczęściej stosowana jest fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH), w której miejsca hybrydyzacji na preparacie cytologicznym obserwuje się w mikroskopie epifluorescencyjnym.

Dokładne procedury znakowania sondy i hybrydyzacji znaleźć można w wielu szczegółowych opracowaniach [m.in. MUKAI 1996; ROGALSKA i in. 1999; SCHWARZACHER, HESLOP-HARRISON 2000; JENKINS, HASTEROK 2001].

Po raz pierwszy u roślin (pszenica) fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* została zastosowana w 1985 roku [RAYBURN, GILL 1985]. Metoda ta używana jest głównie do lokalizacji sekwencji powtarzających się w genomie, m.in. genów dla rRNA. THOMAS i in. [1996, 1997b] zastosowali FISH do określenia liczby i lokalizacji loci 5S i 18S-5,8S-26S rRNA u szeregu gatunków z rodzajów *Lolium* i *Festuca*. Zastosowanie hybrydyzacji *in situ* opartej na sondach stanowiących genomowo-specyficzne sekwencje powtarzalne DNA pozwoliło zidentyfikować chromatynę *F. mairei* ($2n = 4x = 28$) w liniach introgressywnych diploidalnego *L. perenne* [CAO, SLEPER 2001].

Modyfikacją fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) jest genomowa hybrydyzacja *in situ* (GISH), w której całkowity, genomowy DNA jednego z gatunków rodzicielskich mieszańca międzyrodzajowego jest znakowany i użyty jako sonda, natomiast nieznakowany, genomowy DNA drugiego gatunku jest blokerem niespecyficznej hybrydyzacji. Metoda GISH pozwala na identyfikację genomów u mieszańców międzyrodzajowych, genomów ancestralnych u gatunków poliploidalnych, a także identyfikację i lokalizację pojedynczych chromosomów lub ich fragmentów w obcym genomie.

Na materiale roślinnym metoda GISH po raz pierwszy została zastosowana przez SCHWARZACHER i in. [1989] do rozróżnienia genomów rodzicielskich u mieszańca *Hordeum chilense* × *Secale africanum*. Pierwsze badania mieszańców oddalonych kompleksu *Lolium-Festuca* przy użyciu genomowej hybrydyzacji *in situ* przeprowadzili BAILEY i in. [1993] oraz THOMAS i in. [1994].

W literaturze krajowej ukazało się kilka prac przeglądowych opisujących użycie GISH u roślin [m.in. NAGANOWSKA 1994; MAŁUSZYŃSKA 1995]. W niniejszym artykule przedstawiono prace dotyczące zastosowania genomowej hybrydyzacji *in situ* w badaniach genetycznych mieszańców oddalonych traw kompleksu *Lolium-Festuca*.

Identyfikacja mieszańców międzyrodzajowych

Pomimo filogenetycznej separacji i różnic w zawartości DNA [SEAL, REES 1982], gatunki *Lolium* i *Festuca*, a przede wszystkim gatunki obcopolne *Lolium* – *L. multiflorum* ($2n = 2x = 14$) i *L. perenne* ($2n = 2x = 14$) i gatunki obcopolne *Festuca* z sekcji Bovinae – *F. pratensis* ($2n = 2x = 14$) i *F. arundinacea* ($2n = 6x = 42$), krzyżują się stosunkowo łatwo, a ich chromosomy wykazują znaczne pokrewieństwo i zdolność do koniugacji i rekombinacji [JAUHAR 1975]. Przy użyciu konwencjonalnych metod cytogenetycznych (analiza liczby i morfologii chromosomów) nie można rozpoznawać chromosomów *Lolium* i *Festuca* u mieszańców i ich pochodnych. Rozróżnianie chromosomów *Lolium* i *Festuca* stało się możliwe dopiero wtedy, gdy zaczęto stosować metodę genomowej hybrydyzacji *in situ*.

W Pracowni Cytogenetyki IGR PAN w Poznaniu wykonano wiele analiz

genomowej hybrydyzacji *in situ* u mieszańców pochodzących z różnych kombinacji krzyżowań, między innymi u mieszańców triploidalnych – *L. multiflorum* ($2n = 4x = 28$) \times *F. pratensis* ($2n = 2x = 14$) [ZWIERZYKOWSKI i in. 1999], tetraploidalnych *F. pratensis* ($2n = 4x = 28$) \times *L. multiflorum* ($2n = 4x = 28$) [ZWIERZYKOWSKI i in. 1998b] i pentaploidalnych *F. arundinacea* ($2n = 6x = 42$) \times *L. multiflorum* ($2n = 4x = 28$) [ZWIERZYKOWSKI i in. 1998a].

OERTEL i in. [1996] użyli GISH do identyfikacji chromosomów u międzyrodzajowego mieszańca *L. multiflorum* ($2n = 4x = 28$) \times *Dactylis glomerata* ($2n = 4x = 28$). Przeprowadzone analizy jednoznacznie potwierdziły obecność u roślin pokolenia F_1 14 chromosomów *L. multiflorum* i 14 chromosomów *D. glomerata*.

Metoda GISH wykorzystywana jest także do identyfikacji genomów u naturalnych mieszańców międzyrodzajowych traw. U pentaploidalnego ($2n = 5x = 35$) mieszańca x *Festulpia hubbardii*, pochodzącego z krzyżówki *Festuca rubra* ($2n = 6x = 42$) \times *Vulpia fasciculata* ($2n = 4x = 28$), na preparatach cytologicznych po hybrydyzacji stwierdzono 21 chromosomów *Festuca* i 14 chromosomów *Vulpia* [BAILEY i in. 1993].

Badanie struktury genomowej u mieszańcowych pochodnych – introgressywnych i allopoliploidalnych

Introgresja genów między gatunkami *Lolium* i *Festuca* jest zjawiskiem powszechnie znanym i szeroko wykorzystywanym w wielu programach hodowlanych do przenoszenia ważnych cech rolniczych z jednego gatunku do drugiego [HUMPHREYS 1989; THOMAS i in. 1994; HUMPHREYS, GHESQUIERE 1994; GHESQUIERE i in. 1996; HUMPHREYS i in. 1997, 1998a; ZWIERZYKOWSKI i in. 1998a, 1998b, 1999]. Oszacowanie zakresu introgresji stało się możliwe dopiero wtedy, gdy do analiz cytogenetycznych mieszańców *Lolium* \times *Festuca* zaczęto stosować genomową hybrydyzację *in situ*. Liczne translokacje między chromosomami gatunków *Lolium* i *Festuca* świadczą o braku systemu zabezpieczającego przed rekombinacją homeologiczną. U traw kompleksu *Lolium-Festuca* jest więc zupełnie inaczej niż u zbóż; u pszenicy gen *Ph*, zlokalizowany na chromosomie 5B, uniemożliwia wystąpienie rekombinacji pomiędzy chromosomami homeologicznymi.

Analizując za pomocą GISH różnego typu mieszańce i ich pochodne – pokolenia BC_1 *L. multiflorum* ($2x$ i $4x$) \times F_1 [*L. multiflorum* ($4x$) \times *F. pratensis* ($2x$)] oraz pokolenia F_8 *F. pratensis* ($4x$) \times *L. multiflorum* ($4x$) – ZWIERZYKOWSKI i in. [1998b, 1999] zaobserwowali u mieszańców inne niż u form rodzicielskich rozmieszczenie punktów translokacji. Oba gatunki rodzicielskie – *L. multiflorum* i *F. pratensis* – znane są z dystalnej lokalizacji chiazm [REES, DALE 1974]. Natomiast u mieszańców i ich pochodnych punkty translokacji rozmieszczone były wzdłuż całej długości ramion chromosomów, a frekwencja tworzenia chiazm była najwyższa w środkowej części ramion. Taki sam zakres występowania chiazm obserwowali także CANTER i in. [1999] u mieszańców pokolenia F_8 pochodzących z kombinacji *L. perenne* ($4x$) \times *F. pratensis* ($4x$).

Szeroki zakres rekombinacji homeologicznej u mieszańców *Lolium* \times *Festuca* sprawia, że fragmenty chromatyny gatunków *Festuca* mogą być przenoszone do genomu gatunków *Lolium* (i odwrotnie) na drodze krzyżowań wstecznych. Daje to możliwość tworzenia szerokiego spektrum nowych form, a w końcowym etapie odmian introgressywnych. Zastosowanie GISH u form introgressywnych

pozwała prześledzić skuteczność krzyżowania i transferu chromatyny w kolejnych pokoleniach wstecznych oraz umożliwić identyfikację segmentów chromatyny, w której zlokalizowane są geny odpowiedzialne za ważne cechy użytkowe. Obszerne programy badawcze i hodowlane, dotyczące introgresji w obrębie kompleksu *Lolium-Festuca*, są prowadzone m.in. w Wielkiej Brytanii (IGER, Aberystwyth), Francji (INRA, Lusignan) i w Polsce (IGR PAN w Poznaniu, Hodowla Roślin Szelejewo). Są one głównie ukierunkowane na introgresję genów odporności na suszę z *F. arundinacea* oraz genów odporności na chłód z *F. pratensis* do odmian uprawnych *L. multiflorum* i *L. perenne* [HUMPHREYS i in. 2001].

HUMPHREYS i PASAKINSKIENE [1996] krzyżowali wstecznie pentaploidalnego mieszańca *L. multiflorum* ($2n = 4x = 28$) \times *F. arundinacea* ($2n = 6x = 42$) z diploidalną formą *L. multiflorum* ($2n = 2x = 14$) i uzyskali liczne potomstwa introgresywne, które następnie poddali testom na odporność na suszę. Wyselekcjonowane po tych testach formy były analizowane przy użyciu GISH. Jako sondę zastosowano DNA *F. arundinacea*, w celu identyfikacji roślin *L. multiflorum* mających pojedynczy segment chromatyny *Festuca*. Stwierdzono, że translokowany segment, niosący geny odporności na suszę, znajdował się na długim ramieniu chromosomu 2. Jednocześnie zaobserwowano, że do segmentu tego hybrydyzuje również sonda przygotowana z DNA *F. pratensis* (genom *F. pratensis* stanowi jeden z trzech subgenomów alloheksaploidalnego gatunku *F. arundinacea*). Dzięki temu można było stwierdzić, że geny odpowiedzialne za odporność na suszę zostały przeniesione do *L. multiflorum* z *F. pratensis*.

Cecha „stay-green” warunkująca opóźnione starzenie się liści (żółknięcie) determinowana jest przez recesywny allel locus *sid* obecny w zmutowanych liniach *F. pratensis*. Podjęto próbę przeniesienia tej cechy z diploidalnej formy *F. pratensis* do diploidalnych form *L. multiflorum*. Analizy GISH pozwoliły wyselekcjonować linie introgresywne *L. multiflorum* posiadające na jednym z chromosomów pojedynczy segment chromosomu *F. pratensis*. U roślin, które pozytywnie przeszły test na obecność genu „stay-green”, translokowany segment chromatyny *Festuca* znajdował się na długim ramieniu chromosomu 6 [THOMAS i in. 1997a]. W 2000 roku w Wielkiej Brytanii zarejestrowana została pierwsza trawnikowa odmiana introgresywna *L. perenne* Abernile z cechą „stay-green” przeniesioną z *F. pratensis* [ROBSON i in. 2001].

Jednoczesne wykorzystanie genomowej hybrydyzacji *in situ* i analizy markerów molekularnych (np. AFLP i RFLP) u form introgresywnych *Lolium-Festuca* stało się podstawą nowej techniki – mapowania introgresywnego. Dopasowanie grupy markerów do segmentów chromosomowych *Festuca* w garniturze chromosomowym *Lolium* daje możliwość selekcji materiałów roślinnych we wczesnych stadiach rozwoju, co może ułatwić i przyspieszyć proces hodowlany [HUMPHREYS i in. 1997, 1998a; KING i in. 1998, 1999].

PASAKINSKIENE i in. [1997] zastosowali genomową hybrydyzację *in situ* do badania amfipoliploidów, uzyskanych w wyniku traktowania kolchicyną sterylnych roślin pokolenia F_1 *L. multiflorum* ($2n = 2x = 14$) \times *F. arundinacea* ($2n = 6x = 42$). Większość uzyskanych amfipoliploidów stanowiły rośliny oktoploidalne ($2n = 8x = 56$). Nieoczekiwanie znaleziono również kilka roślin diploidalnych ($2n = 2x = 14$). Początkowo przypuszczano, że są to 'czyste' formy *L. multiflorum*. Wykorzystując GISH wykryto jednak, że rośliny te mają w swych zestawach chromosomowych zarówno kompletne chromosomy *Lolium* oraz *Festuca*, jak i chromosomy translokowane. Zdaniem wspomnianych autorów, uzyskane wyniki

świadczą o eliminacji chromosomów i somatycznej rekombinacji podczas procesu podwajania liczby chromosomów.

GISH okazała się być efektywną metodą do określania struktury genomowej amfidiploidalnych odmian *Festulolium*, wyprowadzonych z materiałów pokolenia F_8 mieszańca *F. pratensis* ($4x$) \times *L. multiflorum* ($4x$) [ZWIERZYKOWSKI i in. 1998b]. W analizowanych roślinach, pochodzących z czterech polskich odmian hodowlanych (trzy z nich – Felopa, Sulino i Rakopan – zostały już wpisane do Rejestru Odmian), obserwowano obecność zarówno kompletnych chromosomów *L. multiflorum* i *F. pratensis*, jak i zrekombinowanych chromosomów *Lolium-Festuca*, przy czym przeważały chromosomy zrekombinowane. W całkowitej długości genomu badanych odmian średnia długość chromatyny *L. multiflorum* była nieco większa niż chromatyny *F. pratensis*, i wahała się od 49,2% do 66,7% [ZWIERZYKOWSKI i in. 1998b]. CANTER i in. [1999], stosując GISH u odmiany Prior, powstałej z mieszańca *L. perenne* ($4x$) \times *F. pratensis* ($4x$), obserwowali podobny stosunek długości chromatyny *Lolium* i *Festuca*.

Obok wykorzystania konwencjonalnych programów hodowli, interesującym podejściem do uzyskiwania nowych kombinacji genów jest stosowanie androgenezy u częściowo płodnych mieszańców pokolenia F_1 , a zwłaszcza u roślin pochodzących z zaawansowanych pokoleń. Otrzymane rośliny androgeniczne z obu grup materiałów – pentaploidalnych ($2n = 5x = 35$) roślin pokolenia F_1 mieszańca *L. multiflorum* ($2n = 4x = 28$) \times *F. arundinacea* ($2n = 6x = 42$) i tetraploidalnych ($2n = 4x = 28$) odmian *Festulolium* stanowiących pokolenie F_8 mieszańca *F. pratensis* ($2n = 4x = 28$) \times *L. multiflorum* ($2n = 4x = 28$) – analizowano przy użyciu GISH [HUMPHREYS i in. 1998b; ZWIERZYKOWSKI i in. 1998a; LEŚNIEWSKA i in. 2001]. Analizy wykazały, że większość osobników androgenicznych, uzyskanych z pentaploidalnego mieszańca *F. arundinacea* \times *L. multiflorum*, miała kompletne chromosomy obydwu rodziców oraz chromosomy translokowane. Dzięki GISH możliwe też było wykazanie, że punkty translokacji są rozmieszczone wzdłuż całej długości ramion chromosomów [ZWIERZYKOWSKI i in. 1998a]. Podobne rozmieszczenie miejsc translokacji obserwowano wśród roślin androgenicznych uzyskanych z tetraploidalnych odmian *Festulolium* [LEŚNIEWSKA i in. 2001]. Zmienność struktury genomowej stwierdzono nie tylko pomiędzy roślinami dihaploidalnymi i podwojonymi haploidami, uzyskanymi z różnych roślin wyjściowych *Festulolium*, lecz także wśród roślin pochodzących z tej samej rośliny wyjściowej. Szczególne znaczenie praktyczne mają, nieopisane wcześniej, płodne formy dihaploidalne, mogące stanowić materiał wyjściowy do hodowli odmian *Festulolium* na poziomie diploidalnym.

Efektywne stosowanie metody genomowej hybrydyzacji *in situ* sprawia, że możliwa jest szczegółowa kontrola cytogenetyczna materiałów uzyskiwanych w wyniku introgresji i androgenezy.

Identyfikacja genomów ancestralnych

Wszystkie gatunki z rodzaju *Lolium* występujące w naturze to diploidy ($2n = 2x = 14$), natomiast w rodzaju *Festuca* występują gatunki o różnym poziomie poliploidalności, od diploidów ($2n = 2x = 14$) do dekaploidów ($2n = 10x = 70$), przy czym zdecydowanie dominują gatunki poliploidalne.

CHANDRASEKHARAN i THOMAS [1971] wysunęli hipotezę, iż heksaploidalna *F.*

arundinacea ($2n = 6x = 42$) jest gatunkiem allopoliploidalnym złożonym z trzech różnych genomów. Potwierdzenie tej hipotezy było możliwe dopiero po zastosowaniu GISH [HUMPHREYS i in. 1995]. Analizy przeprowadzone na różnych mieszańcach uzyskanych z krzyżowania *F. pratensis* ($2n = 2x = 14$), *F. glaucescens* ($2n = 4x = 28$) i *F. arundinacea* ($2n = 6x = 42$) wykazały, że gatunek *F. arundinacea* jest rzeczywiście alloheksaploidem, powstałym z połączenia genomu diploidalnej *F. pratensis* z dwoma genomami tetraploidalnej *F. glaucescens*.

Genomowa hybrydyzacja *in situ* została również użyta do badania pokrewieństwa pomiędzy *L. multiflorum* i trzema gatunkami kostrzew: *F. pratensis* ($2x$), *F. glaucescens* ($4x$) i *F. arundinacea* ($6x$) [PASAKINSKIENE i in. 1998]. Stosując jako sondę genomowy DNA *L. multiflorum*, autorzy obserwowali liczne miejsca hybrydyzacji sondy do chromosomów *F. pratensis* (tzw. GISH bands), świadczące o bliskim pokrewieństwie obu gatunków. Wyniki mówiące o pokrewieństwie tych gatunków, uzyskane za pomocą GISH, zostały potwierdzone po zastosowaniu analiz markerów molekularnych.

Zastosowanie GISH w analizie mejozy

Stosując metodę GISH można rozróżniać chromosomy gatunków rodzicielskich u mieszańców oddalonych i ich form pochodnych także w czasie podziału mejotycznego, a co za tym idzie, badać częstość koniugacji między chromosomami homologicznymi i homeologicznymi. KING i in. [1999] przeprowadzili analizy mejozy u triploidalnego mieszańca *L. perenne* ($2n = 4x = 28$) \times *F. pratensis* ($2n = 2x = 14$). GISH umożliwiła identyfikację chromosomów *L. perenne* i *F. pratensis* w różnych konfiguracjach chromosomowych w analizowanych komórkach macierzystych pyłku. CAO i in. [2000] użyli GISH do badania koniugacji chromosomów u triploidalnego mieszańca *L. perenne* ($2n = 2x = 14$) \times *F. mairei* ($2n = 4x = 28$) o formule genomowej $LLM_1M_1M_2M_2$. Uzyskane wyniki pokazały, że koniugować mogą między sobą nie tylko chromosomy z genomów M_1 i M_2 , lecz także chromosomy *L. perenne* z chromosomami obu genomów *F. mairei*.

Podsumowując niniejszy przegląd prac można stwierdzić, iż genomowa hybrydyzacja *in situ* jest szybką i precyzyjną metodą, niezwykle przydatną w wielu badaniach cytogenetycznych i programach hodowlanych. Zakres zastosowania GISH u traw kompleksu *Lolium-Festuca* jest jednak ograniczony do analiz mieszańców międzyrodzajowych, nie można natomiast przy jej użyciu identyfikować genomów gatunków blisko spokrewnionych, np. mieszańców międzygatunkowych *L. multiflorum* \times *L. perenne*.

Literatura

- BAILEY J.P., BENNETT S.T., BENNETT M.D., STACE C.A. 1993. *Genomic in situ hybridization identifies parental chromosomes in the wild grass hybrid xFestulopia hubbardii*. Heredity 71: 413–420.
- CANTER P.H., PASAKINSKIENE I., JONES R.N., HUMPHREYS M.W. 1999. *Chromosome substitution and recombination in the amphiploid Lolium perenne \times Festuca pratensis cv Prior ($2n = 4x = 28$)*. Theor. Appl. Genet. 98: 809–814.
- CAO M., SLEPER D.A. 2001. *Use of genome-specific repetitive DNA sequences to moni-*

tor chromatin introgression from Festuca mairei into Lolium perenne. Theor. Appl. Genet. 103: 248–253.

CAO M., SLEPER D.A., DONG F., JANG J. 2000. *Genomic in situ hybridization (GISH) reveals high chromosome pairing affinity between Lolium perenne and Festuca mairei*. Genome 43: 398–403.

CHANDRASEKHARAN P., THOMAS H. 1971. *Studies in Festuca V. Cytogenetic relationships between species of bovinae and scariosae*. Z. Pflanzenzücht. 65: 345–354.

GHESEQUIERE M., EMILE J.-C., JADAS-HECART J., MOUSSET C., TRAINEAU R., POISSON C. 1996. *First in vitro assessment of feeding value of Festulolium hybrids derived from Festuca arundinacea var. glaucescens and selection for palatability*. Plant Breed. 115: 238–244.

HUMPHREYS M.W. 1989. *The controlled introgression of Festuca arundinacea genes into Lolium multiflorum*. Euphytica 42: 105–116.

HUMPHREYS M.W., GHESEQUIERE M. 1994. *Assessing success in gene transfer between Lolium multiflorum and Festuca arundinacea*. Euphytica 77: 283–289.

HUMPHREYS M.W., GHESEQUIERE M., ZWIERZYKOWSKI Z., RAPACZ M., ROGNLI O.A., OSTREM L. 2001. *A pan-european approach to 'dissecting' stress resistance traits in the forage grasses*. Proc. of the 23th Meeting of EUCARPIA Forage Crops and Amenity Grasses Section. Azores, Portugal, 1–5 X 2000: 10 ss.

HUMPHREYS M.W., PASAKINSKIENE I. 1996. *Chromosome painting to locate genes for drought resistance transferred from Festuca arundinacea to Lolium multiflorum*. Heredity 77: 530–534.

HUMPHREYS M.W., PASAKINSKIENE I., JAMES A. R., THOMAS H. 1998a. *Physically mapping quantitative traits for stress-resistance in the forage grasses*. J. Exp. Bot. 49: 1611–1618.

HUMPHREYS M.W., THOMAS H.M., HARPER J.A., MORGAN M.G., JAMES A., ZARE A.G., THOMAS H. 1997. *Dissecting drought- and cold-tolerance traits in the Lolium-Festuca complex by introgression mapping*. New Phytol. 137: 55–60.

HUMPHREYS M.W., THOMAS H.M., MORGAN W.G., MEREDITH M.R., HARPER J.A., THOMAS H., ZWIERZYKOWSKI Z., GHESEQUIERE M. 1995. *Discriminating the ancestral progenitors of hexaploid Festuca arundinacea using genomic in situ hybridization*. Heredity 75: 171–174.

HUMPHREYS M.W., ZARE A.G., PASAKINSKIENE I., THOMAS H., ROGERS W.J., COLLIN H.A. 1998b. *Interspecific genomic rearrangements in androgenic plants derived from a Lolium multiflorum × Festuca arundinacea (2n = 5x = 35) hybrid*. Heredity 80: 78–82.

JAUHAR P.P. 1975. *Chromosome relationships between Lolium and Festuca (Gramineae)*. Chromosoma 52: 103–121.

JENKINS G., HASTEROK R. 2001. *Painting whole chromosome sets in hybrids using GISH, w: Advanced molecular cytogenetics*. J. Małuszyńska, R. Hasterok, D. Schweizer (red.). Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego, Katowice: 35–48.

KING I.P., MORGAN W.G., ARMSTEAD I.P., HARPER J.A., HAYWARD M.D., BOLLARD A., NASH J.V., FORSTER J.W., THOMAS H.M. 1998. *Introgression mapping in the grasses. I. Introgression of Festuca pratensis chromosomes and chromosome segments into Lolium perenne*. Heredity 81: 462–467.

KING I.P., MORGAN W.G., HARPER J.A., THOMAS H.M. 1999. *Introgression mapping in the grasses. II. Meiotic analysis of the Lolium perenne/Festuca pratensis triploid hy-*

brid. *Heredity* 82: 107–112.

LEŚNIEWSKA A., PONITKA A., ŚLUSARKIEWICZ-JARZINA A., ZWIERZYKOWSKA E., ZWIERZYKOWSKI Z., JAMES A. R., THOMAS H., HUMPHREYS M.W. 2001. *Androgenesis from Festuca pratensis* × *Lolium multiflorum* amphidiploid cultivars in order to select and stabilize rare gene combinations for grass breeding. *Heredity* 86: 167–176.

MAŁUSZYŃSKA J. 1995. *Hybrydyzacja kwasów nukleinowych in situ: od ISH do DIRVISH*. *Biotechnologia* 2: 92–101.

MUKAI Y. 1996. *In situ hybridization*, w: *Plant Chromosomes: Laboratory Methods*. K. Fukui, S. Nakayama (red.). CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo: 155–170.

NAGANOWSKA B. 1994. *Możliwości wykorzystania hybrydyzacji in situ do badań genu mieszańców traw*. *Genet. Pol.* 35A: 19–24.

OERTEL C., FUCHS J., MATZK F. 1996. *Successful hybridization between Lolium and Dactylis*. *Plant Breed.* 115: 101–105.

PASAKINSKIENE I., ANAMTHAWAT-JONSSON K., HUMPHREYS M.W., JONES R.N. 1997. *Novel diploids following chromosome elimination and somatic recombination in Lolium multiflorum* × *Festuca arundinacea* hybrids. *Heredity* 78: 464–469.

PASAKINSKIENE I., ANAMTHAWAT-JONSSON K., HUMPHREYS M.W., PAPLAUSKIENE V., JONES R.N. 1998. *New molecular evidence on genome relationships and chromosome identification in fescue (Festuca) and ryegrass (Lolium)*. *Heredity* 81: 659–665.

RAYBURN A.L., GILL B.S. 1985. *Use of biotin-labelled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes*. *J. Heredity* 76: 78–81.

REES H., DALE P.J. 1974. *Chiasmata and variability in Lolium and Festuca populations*. *Chromosoma* 47: 335–351.

ROBSON P., DONNISON I., THOROGOOD D., COWAN S., OUGHAM H., THOMAS H. 2001. *New ways to stay green*. *IGER Innovations* 5: 12–15.

ROGALSKA S., MAŁUSZYŃSKA J., OLSZEWSKA M.J. 1999. *Podstawy cytogenetyki roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa: 266 ss.

SCHWARZACHER T., HESLOP-HARRISON P. 2000. *Practical in situ hybridization*. BIOS. Oxford: 216 ss.

SCHWARZACHER T., LEITCH A. R., BENNET M.D., HESLOP-HARRISON J.S. 1989. *In situ localization of parental genomes in a wide hybrid*. *Ann. Bot.* 64: 315–324.

SEAL A.G., REES H. 1982. *The distribution of quantitative DNA changes associated with the evolution of diploid Festucae*. *Heredity* 49: 179–190.

THOMAS H.M. 1977. *Giemsa banding in Lolium temulentum*. *Can. J. Genet. Cytol.* 19: 663–666.

THOMAS H.M. 1981. *The giemsa karyotypes of six Lolium species*. *Heredity* 46: 263–267.

THOMAS H., EVANS C., THOMAS H.M., HUMPHREYS M.W., MORGAN G., HAUCK B., DONNISON I. 1997a. *Introgression, tagging and expression of a leaf senescence gene in Festulolium*. *New Phytol.* 137: 29–34.

THOMAS H.M., HARPER J.A., MEREDITH M.R., MORGAN W.G., KING I.P. 1997b. *Physical mapping of ribosomal DNA sites in Festuca arundinacea and related species by in situ hybridization*. *Genome* 40: 406–410.

THOMAS H.M., HARPER J.A., MEREDITH M.R., MORGAN W.G., THOMAS I.D., TIMMS E.,

KING I.P. 1996. *Comparison of ribosomal DNA sites in Lolium species by fluorescence in situ hybridization*. Chrom. Res. 4: 486–490.

THOMAS H.M., MORGAN W.G., MEREDITH M.R., HUMPHREYS M.W., THOMAS H., LEGGETT J.M. 1994. *Identification of parental and recombined chromosomes in hybrid derivatives of Lolium multiflorum × Festuca pratensis by genomic in situ hybridization*. Theor. Appl. Genet. 88: 909–913.

ZWIERZYKOWSKI Z., LUKASZEWSKI A.J., LEŚNIEWSKA A., NAGANOWSKA B. 1998a. *Genomic structure of androgenic progeny of pentaploid hybrids, Festuca arundinacea × Lolium multiflorum*. Plant Breed. 117: 457–462.

ZWIERZYKOWSKI Z., LUKASZEWSKI A.J., NAGANOWSKA B., LEŚNIEWSKA A. 1999. *The pattern of homoeologous recombination in triploid hybrids of Lolium multiflorum with Festuca pratensis*. Genome 42: 720–726.

ZWIERZYKOWSKI Z., TAYYAR R., BRUNELL M., LUKASZEWSKI A.J. 1998b. *Genome recombination in intergeneric hybrids between tetraploid Festuca pratensis and Lolium multiflorum*. J. Heredity 89: 324–328.

Słowa kluczowe: cytogenetyka molekularna, genomowa hybrydyzacja *in situ*, GISH, FISH, kompleks *Lolium-Festuca*, mieszańce międzyrodzajowe

Streszczenie

Genomowa hybrydyzacja *in situ* (GISH) jest techniką z pogranicza cytogenetyki i biologii molekularnej. Pozwala ona na identyfikację genomów ancestralnych u gatunków poliploidalnych, zestawów chromosomów form rodzicielskich u mieszańców międzyrodzajowych, jak również pojedynczych chromosomów lub ich fragmentów w obcym genomie. Niniejszy artykuł stanowi przegląd prac dotyczących zastosowania GISH w badaniach genetycznych mieszańców oddalonych traw kompleksu *Lolium-Festuca*.

APPLICATION OF GENOMIC *in situ* HYBRIDIZATION IN GENETIC STUDIES OF WIDE HYBRIDS WITHIN THE *Lolium-Festuca* COMPLEX

Agnieszka Leśniewska-Bocianowska, Arkadiusz Kosmala, Maria Skibińska,
Zbigniew Zwierzykowski

Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznań

Key words: genomic *in situ* hybridization, GISH, FISH, *Lolium-Festuca* complex, intergeneric hybrids, molecular cytogenetics

Summary

Genomic in situ hybridization (GISH) combines cytogenetic and molecular techniques. GISH is used to identify ancestral genomes in polyploid species, pa-

rental chromosomes in intergeneric hybrids and single chromosomes and their fragments in foreign genome. The article presents a review of publications concerning the application of GISH in genetic studies of wide hybrids within the *Lolium-Festuca* complex.

Doc. dr hab. Zbigniew **Zwierzykowski**
Instytut Genetyki Roślin PAN
ul. Strzeszyńska 34
60-479 POZNAŃ
e-mail: zzwi@igr.poznan.pl