



Różnicowanie się organów generatywnych u roślin dwupiennych

Wojciech Dastych, Elżbieta Zenkteler

Zakład Botaniki Ogólnej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

Differentiation of generative organs in dioecious species

Summary

Flowering plants are mostly hermaphroditic (i.e. bear both stamens and pistils). In the course of evolution such progenitors have repeatedly given rise to species with separate male and female individuals. Plants display a great variety of sexual systems that could be reduced to three types: 1) the two sexes occurring on separate plants; 2) both sexes occurring in the same individual; 3) a combination of the former possibilities. Gender is determined by genotype, but the mechanisms of determination are extremely diverse among species. The determinants of sexual phenotype range from sex chromosomes (*Silene latifolia*), through hormonal regulation (*Cucumis sativa*), to pheromonal contacts (between fern gametophytes). *Salix viminalis*, as a dioecious species, revealed sexual dimorphism (occurring in a flowering stage). In their breeding as a short-rotation energy crop, an early determination of sex would be necessary to remove, for agronomic reasons, the male plants. Within Salicaceae a multi-locus sex determination system is the main model of sexual differentiation. Despite the fact that a great progress has been achieved in identification of genes that regulate sex expression, future efforts will be necessary to recognize these processes at the molecular level.

Key words:

sexual determination, monoecy, dioecy, sex chromosomes.

Adres do korespondencji

Elżbieta Zenkteler,
Zakład Botaniki Ogólnej,
Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza,
ul. Umultowska 89,
61-614 Poznań.

1. Wstęp

Rośliny dwupienne i ich przejściowe formy są szeroko rozpowszechnione w obrębie królestwa roślin kwiatowych. Obecne są wśród 160. rodzin, co sugeruje wielokrotne powstawanie tej cechy w toku ewolucji roślin. W kwiatach wielu gatunków dwu-

piennych, we wczesnej fazie ontogenezy tego organu, odnajdywano zawiązki struktur przeciwnej płci, co wskazywałoby, że zmiana odpowiadająca za powstanie jednopłciowości wśród okrytozalążkowych miała miejsce w stosunkowo niedawnej przeszłości. Zakładając, że osobniki 'najmłodsze' ewolucyjnie posiadały kwiaty obupłciowe lub kwiaty męskie i żeńskie, przejściu od hermafrodytyzmu do jednopienności każdorazowo musiała towarzyszyć mutacja odpowiedzialna za pojawienie się genów sterility organów jednej z płci. Przypuszcza się, że spadek częstotliwości rekombinacji w rejonach genu objętych zmianami, mógł stanowić pośrednią przyczynę wykształcenia się chromosomów płci u niektórych gatunków roślin.

2. Ewolucja dwupienności

Za powstaniem dwupienności u roślin kryją się najprawdopodobniej dwie równoległe tendencje: dążenie do całkowitej eliminacji zjawiska samozapłodnienia, co wyraźnie zaznacza się u gatunków zapylanych przy współudziale zwierząt oraz selekcja ukierunkowana na zwiększenie specjalizacji organów generatywnych (1). Rozważając adaptacyjne korzyści tendencji specjalizacyjnej dostrzegamy u roślin obupłciowych wzajemnie ograniczanie jednoczesnej produkcji pyłku i komórek jajowych. Ryzyko samozapylenia może zostać wyeliminowane poprzez wykształcenie odrębnych kwiatów męskich i żeńskich. Umożliwia to bardziej efektywne rozlokowanie organów reprodukcyjnych, uzyskujących większą przestrzeń dla rozwoju, przy czym korzyści mogą wiązać się nie tylko ze zmianami w budowie pojedynczych struktur rozrodczych, ale i całych kwiatostanów.

Układ elementów kwiatu ma ogromne znaczenie w procesach związanych z produkcją dużych ilości pyłku, jak i skutecznym jego przyjęciem przez znamię słupka. U roślin obupłciowych obserwowano różnorakie strategie adaptacji do określonego typu zapylania. Przystosowania roślin wiatropylnych są podobne do przystosowań powszechnie spotykanych u roślin dwupiennych; kwiaty pręcikowe występują zwykle w długich, zwisających i elastycznych kwiatostanach, co zwiększa efektywność dyspersji pyłku, podczas gdy kwiaty i kwiatostany żeńskie są bardziej skrócone i zwarte, a znamiona ich słupków wyeksponowane. Nieprzypadkowe jest także rozmieszczenie obydwu typu kwiatów: kwiaty męskie drzew osadzone są na gałęziach wiotkich i cieńszych, a żeńskie na gałęziach grubszych i sztywniejszych, ze względu na konieczność wytworzenia solidnej konstrukcji, zdolnej utrzymać ciężar owoców. W procesach ukierunkowanej selekcji odpowiedzialnej za ewolucję dwupienności, określone tendencje nie wykluczały się wzajemnie, a często mogły występować równocześnie.

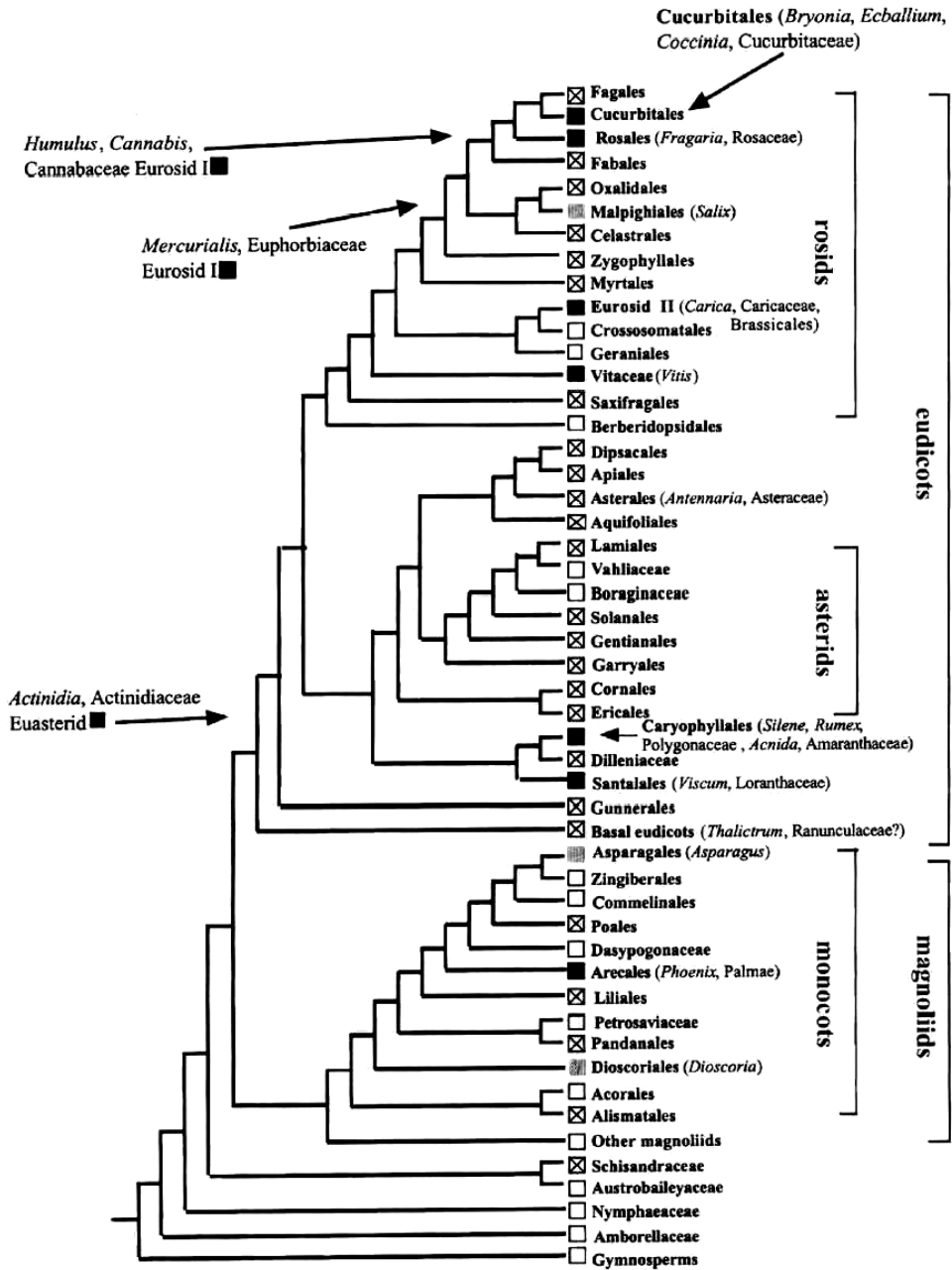
Prawdopodobnym torem ewolucji, który zaowocował wytworzeniem dwupienności: była droga bezpośrednia – od osobnika o kwiatach obupłciowych do osobników rozdzielnopłciowych, lub pośrednia, poprzez jednopiennosc lub sterility. W ramach pierwszej możliwości zachodziła konieczność utrwalenia się w tym samym czasie dwóch niezależnych od siebie mutacji, przy czym geny w obrębie któ-

rych zaszłyby zmiany powodujące bezpłodność pręcików w kwiatach żeńskich i słupków w kwiatach męskich, musiałyby leżeć w bezpośredniej bliskości, w przeciwnym razie możliwość rekombinacji wewnątrz zmutowanych alleli spowodowałaby ryzyko wtórnej konwersji do hermafrodytyzmu. Z powodu opisanych zagrożeń zakłada się raczej dwuetapową drogę przejścia od jedno- do dwupienności, przy czym etapem pośrednim byłby osobnik posiadający kwiaty doskonałe oraz żeńskie (lub doskonałe oraz męskie). W tym ostatnim przypadku obydwie mutacje byłyby rozdzielone w czasie, co znacznie zwiększałoby prawdopodobieństwo proponowanego scenariusza, który należy do najczęściej rozpatrywanych (2).

Populacje roślin wykształcających kwiaty obupłciowe obok kwiatów męskich spotyka się w przyrodzie niezmiernie rzadko. Na uwagę zasługuje jednak fakt, że gatunki o tym typie kwiatów, są najczęściej blisko spokrewnione z gatunkami dwupiennymi. Potwierdza to przypuszczenie, że przynajmniej część gatunków, u których występuje rozdział płci, rozwinęła się w następstwie dwóch pojedynczych mutacji, z których pierwsza spowodowała całkowitą lub częściową sterylność kwiatów żeńskich. Prawdopodobnie przedział czasowy między obydwoma zaszłościami był stosunkowo krótki, a nieliczne, współczesne przypadki populacji reprezentujących ten model płciowości (np. *Datisca glomerata* lub *Mercurialis annua*) są skutkiem wtórnego rozejścia się dróg rozwojowych w obrębie roślin o pełnej dwupienności (3).

Gatunki roślin, które tworzą populacje złożone z osobników obupłciowych i żeńskich, występują w przyrodzie znacznie częściej, niż gatunki tworzące formy hermafrodytyczne obok męskich; z tego też względu, układ ten jest znacznie częściej proponowany jako model stanu przejściowego w ewolucji roślin dwupięnych. Występowanie tego rodzaju relacji w obrębie fenotypów płci jest zjawiskiem powszechnym u gatunków spokrewnionych z roślinami dwupiennymi. Wykazano, że mutacja w pojedynczym genie, bądź aktywacja całego systemu cytoplazmatycznego, prowadząca do sterylności kwiatów męskich, w populacjach roślin obupłciowych będzie rozprzestrzeniać się bardzo szybko, jeżeli powstałe mutanty okażą się bardziej żywotne w następstwie wyższej przeżywalności osobników żeńskich, w porównaniu z osobnikami o kwiatach doskonałych (4). W populacjach o malejącej skuteczności krzyżowego zapłodnienia mutacje takie utrwalają się łatwo, niezależnie od stopnia przeżywalności mutantów (2). Ze względu na dość powszechne występowanie zjawiska „żeńskiej” dwupienności (np. *Plantago coronopus*) można przyjąć, że sterylność pręcików w kwiatach obupłciowych może przynosić korzyści całej populacji, ze względu na umożliwienie dostępu obcego pyłku do komórek jajowych.

Drugi szlak ewolucyjny, wiedzie do dwupienności poprzez rośliny jednopienne, u których obok kwiatów męskich występują kwiaty żeńskie. Ten model dotyczy sporej grupy roślin dwupięnych, do których zalicza się m. in. *Mercurialis* sp. W ich przypadku, wytworzenie się odrębnych płci mogło nastąpić w wyniku serii mutacji, które spowodowały zmianę proporcji liczbowej kwiatów męskich w stosunku do kwiatów żeńskich (5). Cechą wspólną gatunków dwupięnych, które wyewoluowały bezpośrednio od jednopięnych, może być, jak się wydaje, ich stosunkowo niska



☒ Występowanie dwupienności ■ Obecność chromosomów płci ☐ Brak chromosomów płci

Rys. Występowanie dwupienności i chromosomów płci w obrębie roślin okrytonasiennych. Na podstawie analizy filogenetycznej wg Soltis i in. (36) – zmienione.

stabilność, przejawiająca się konwersją płci kwiatów, pod wpływem działania określonych czynników środowiskowych. Szczególnie interesujący jest przykład dwupiennej figi (*Ficus* spp.) zapylanej przez osy. Dwupienne gatunki fig występują powszechnie w niższych piętrach lasu, natomiast do piętra koron dorastają formy jednopienne. Choć nie ulega wątpliwości, że formy dwupienne także i w tym przypadku wyewoluowały z form jednopiennych, to mechanizm odpowiedzialny za ten proces nie jest do końca poznany, przy czym nie można wykluczyć zwykłego unikania ryzyka samozapłodnienia. W tym konkretnym przypadku, w grę wchodzi czynnik związany ze specyfiką procesu zapylania. Opisany układ jedno- i dwupiennych drzew ogranicza negatywny wpływ os pasożytniczych na gatunki os pożytecznych, przenoszących pyłek, zatem dwupienność fig może również przynosić korzyść kooperujących z nimi gatunkom owadów (6).

Trzeci szlak prowadzący do dwupienności dotyczy populacji osobników o kwiatkach obupłciowych, z wysokim stopniem polimorfizmu pod względem budowy i usytuowania kwiatów. Tendencja różnicująca wewnątrz populacji, wiąże się ze wzrostem specjalizacji w skutecznym rozsiewaniu pyłku jak i z dążeniem do całkowitego wyeliminowania zjawiska samozapłodnienia, co doprowadziło ostatecznie do wykształcenia się oddzielnych osobników płci żeńskiej i męskiej (7).

Dla prób zrekonstruowania wczesnych etapów ewolucji u różnych grup roślin dwupiennych szczególne znaczenie mają wyniki wskazujące, że *Amborella trichopoda*, wiecznie zielony, dwupienny krzew endemiczny z Nowej Kaledonii, stanowił pierwsze ogniwo w ewolucji roślin okrytonasiennych (8). W związku z tym nasuwa się pytanie, czy pierwsze rośliny okrytonasienne cechowały się dwupiennością, a obupłciowość była w ich przypadku zjawiskiem wtórnym, które zdominowało ówczesną florę, czy też część z nich zdołała powrócić do pierwotnej formy. Mimo wysokiego prawdopodobieństwa zaistnienia takiego scenariusza prostszym rozwiązaniem byłoby, jak się wydaje, przyjęcie założenia, że dwupienność wśród osobników linii prowadzącej do *Amborella* sp. była zjawiskiem wtórnym.

3. Determinacja płci u roślin dwupiennych

Pomimo badań obejmujących liczne gatunki roślin, nie dysponujemy wystarczającym zasobem informacji o mechanizmach molekularnych, odpowiadających za determinację płci u roślin. Trudności sprawia nawet ustalenie liczby genów zaangażowanych w ten proces, zwłaszcza, że genów wywołujących sterylność odpowiednich organów nie można zaliczyć do grupy genów determinujących płeć w ścisłym tego słowa znaczeniu. Proste i mało skomplikowane modele np. *Ecballium elaterium* (tryskawiec sprężysty), u którego wykształcenie się osobników dwupiennych, jak i sama płeć, zdeterminowane są pojedynczym genem posiadającym trzy różne allele, należą do wyjątków. Dlatego badania zmierzające do wyizolowania genów determinujących płeć u roślin bazują na dwóch odmiennych strategiach. Pierwsza, wyko-

rzystuje geny homeotyczne zaangażowane w rozwój kwiatu u modelowych roślin obupłciowych, takich jak *Arabidopsis* (rzodkiewnik) czy *Antirrhinum* (wyżlin); druga opiera się na użyciu metod takich jak RAPD, AFLP lub RFLP- ukierunkowanych na poznanie sekwencji DNA, zwłaszcza leżących w obrębie chromosomów płci, bądź też transkryptów szczególnie obiecujących loci.

Klasycznym przykładem genów homeotycznych, które sprawują kontrolę nad procesem ustalania tożsamości organów w okółkach kwiatów roślin obupłciowych jest układ MADS-box (9). W modelu, który skonstruowano opierając się na wynikach badań nad mutacjami stymulującymi zmiany w układzie okółków kwiatowych u *Antirrhinum* i *Arabidopsis* zakłada się, że typ mających wykształcić się organów uwarunkowany jest regulacją ekspresji w obrębie trzech domen genów homeotycznych, oznaczonych odpowiednio literami A, B i C. Każdemu typowi organu kwiatowego przyporządkowano specyficzny wzór ekspresji: w przypadku działek kielicha zaznacza się aktywność transkrypcyjna genów zaliczanych do domeny A, w obrębie drugiego okółka (płatków) ekspresji ulegają zarówno geny domeny A jak i B. Wzór ekspresji specyficzny dla organów generatywnych męskich związany jest z genami funkcjonalnymi B i C, natomiast w przypadku organów żeńskich – wyłącznie z genami z grupy C (9). Produkty białkowe wszystkich wymienionych grup genów łączy wspólna cecha: którą jest charakterystyczna domena na N-końcu (MADS-box), służąca przypuszczalnie do wiązania DNA.

Mutacje w obrębie genów homeotycznych skutkują rozwojem organów kwiatowych w niewłaściwym dla nich miejscu. Pełna mutacja wewnątrz określonego genu, należącego do klasy C u *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik pospolity) prowadzi do zastąpienia pręcików i owocolistków przez płatki korony (10); z kolei w efekcie indukowanych zmian w strukturze genu domeny B zaobserwowano konwersję płatków do działek kielicha w drugim okółku oraz pręcików do owocolistków w okółku następnym, skutkiem czego wykształciły się kwiaty funkcjonalnie żeńskie (11). Badacze zajmujący się zjawiskiem dwupienności wysunęli roboczą hipotezę, że analogiczne mechanizmy występują w przypadku roślin o ustalonym dymorfizmie płciowym. Stwierdzono, że chociaż przypadki konwersji organów kwiatowych w warunkach naturalnych zdarzają się u nich niezmiernie rzadko, to za inhibicję rozwoju określonych organów generatywnych odpowiadałby odmienny wzór ekspresji genów zaliczanych do klasy B i C. Aby zweryfikować te przypuszczenia, w połowie lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku przeprowadzono odpowiednie badania na dwóch najlepiej poznanych gatunkach roślin dwupiennych, a mianowicie na *Silene latifolia* (bniec biały) (12) i *Rumex acetosa* (szczaw zwyczajny) (13). W przypadku pierwszego gatunku, merystem kwiatowy przechodził przez fazę obupłciowości zarówno w kwiatach męskich jak i żeńskich. Rozwój owocolistków w kwiatach męskich został zahamowany wkrótce po zainicjowaniu ich wzrostu, podczas gdy związki pręcików w kwiatach żeńskich rozwijały się bez przeszkód, aż do uformowania tapetum, wyściełającego światło komory pylnika. Na podstawie wyników analizy ekspresji genów z grupy MADS-box u *Silene* wykazano, że w przypadku genów spe-

cyficznych dla płatków i pręcików (a zatem zaliczanych do klasy B): *SLM2* i *SLM3* realizowany przez nie wzór przestrzenny okazał się różny dla przeciwnych płci. Wprawdzie w obu przypadkach ekspresja tych genów ograniczała się do regionów inicjujących wzrost płatków i pręcików, jednak w przypadku kwiatów męskich ten obszar umiejscowiony był w centralnej części merystemu. Taki model ekspresji genów *SLM 2* i *SLM 3* powoduje, że centralny okółek w kwiatach żeńskich przewyższa znacznie rozmiarami analogiczny obszar w merystemie kwiatowym osobników męskich, podczas gdy okółek pręcików ma podobną wielkość u obydwu płci. W związku z tym zawiązki słupków u osobników męskich są znacznie mniejsze niż analogiczne struktury w kwiatach żeńskich i hermafrodytycznych. Przypuszcza się, że geny odpowiedzialne za inhibicję rozwoju słupkowiecia (a zatem zaangażowane bezpośrednio w proces wykształcania się dychotomii płci) hamują jednocześnie procesy wzrostu i podziału komórek w obrębie centralnego okółka kwiatu. Abstrahując od tych uwag, należy podkreślić, że geny grupy MADS-box nie odgrywają istotnej roli w różnicowaniu się płci u *Silene latifolia*, gdyż wzór ekspresji odpowiednich genów nie odbiega od schematu realizowanego w przypadku kwiatów doskonałych, pomimo drobnych różnic, jakie występują między kwiatami męskimi i żeńskimi (12).

Podobne badania przeprowadzono dla *Rumex acetosa* (szczaw zwyczajny), o kwiatach zawierających dwa zewnętrzne okółki płatków, z umieszczonym centralnie słupkowieciem w przypadku osobników żeńskich, lub też z wewnętrznym okółkiem złożonym z trzech pręcików u osobników płci męskiej. W części centralnej merystemu kwiatów męskich nie obserwowano podziałów komórkowych, nie znaleziono również zawiązków męskich organów generatywnych w obrębie kwiatów żeńskich. Pomimo tych faktów okazało się, że sekwencja *RAP1*, ze względu na swoją funkcję zaliczona do grupy genów homeotycznych klasy C, ulega ekspresji w obydwu wewnętrznych okółkach kwiatów męskich jak i żeńskich u *Rumex*, mimo że w rejonie, w którym zawiązują się organy płci przeciwnej ekspresja ustaje na bardzo wczesnym etapie. Okazuje się, że u *Rumex acetosa* kwiaty obydwu płci przechodzą najpierw przez fazę hermafrodytyczną, morfologicznie trudną do zidentyfikowania (13). U *Silene* natomiast poziom ekspresji genu *SLM1* w ulegających funkcjonalnej degradacji organach płciowych, utrzymywał się na stałym poziomie. Aby wyprowadzić jednoznaczne wnioski z tych obserwacji konieczne okazuje się eksperymentalne skonstruowanie transgenicznych roślin, u których ekspresja genu C odbywająca się w sposób ciągły, umożliwiłaby udzielenie jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy zanik ekspresji genu C jest w tym przypadku przyczyną, czy też skutkiem aborcji odpowiednich organów generatywnych. Jeśli prawdziwa okaże się pierwsza możliwość, wówczas otrzymamy osobniki o kwiatach obupłciowych.

Inne geny z grupy MADS-box, które zdołano zidentyfikować u *Rumex acetosa*: *RAD1* i *RAD2* zaliczone do grupy genów homeotycznych klasy B, podlegają ciągłej transkrypcji w rejonie trzeciego okółka kwiatu, bez względu na jego płeć, przy czym wzór ekspresji dla tych sekwencji nie ujawnia płciowych różnic pod względem

obszaru zajmowanego przez okółek wewnętrzny, tak jak to miało miejsce w przypadku bnieca białego.

Udział genów homeotycznych MADS-box klasy A, B i C kontrolujących wykształcanie się dymorfizmu kwiatów u roślin dwupiennych, okazuje się bardziej prawdopodobny u tych gatunków, u których nie dochodzi do inicjowania wzrostu organów przeciwnej płci, a merystem kwiatowy w swym rozwoju pomija fazę obupłciowości (np. *Mercurialis*, *Spinacia oleracea*, *Cannabis sativa*). Potwierdzono to na podstawie wyników badań u *Humulus lupulus* (chmiel zwyczajny), w których wykazano występowanie różnic w ekspresji homeotycznego genu B u osobników przeciwnej płci (14). Jak z tego wynika, u omawianych gatunków dwupiennych różnicowanie płci zachodzi częściej poprzez hamowanie rozwoju 'niewłaściwych' organów generatywnych aniżeli przez zmianę ich pierwotnej tożsamości.

Próby izolacji genów determinujących płęć u roślin dwupiennych na bazie ich znanych odpowiedników (zarówno w obrębie genomów roślin jednopiennych i dwupiennych), ogranicza niewielkie prawdopodobieństwo, że dana sekwencja, nawet przy dużym stopniu homologii, będzie pełnić tę samą rolę u dwóch nie spokrewnionych ze sobą gatunków.

Geny indukujące proces różnicowania się jednopłciowych kwiatów (i w tym sensie różne od „kaskad” genów, których ekspresja powoduje różnice w budowie organów płciowych) powstały najprawdopodobniej w wyniku duplikacji, której towarzyszyło ich funkcjonalne rozejście się. Dobrym przykładem jest gen *TASSELSEED2*, który w przypadku *Zea mays* powoduje konwersję płci w obrębie męskich kwiatostanów, stymulując rozwój słupkowie i jednocześnie hamując rozwój pręcików (15). Fakt, że u kukurydzy sekwencja ta wywiera bezpośredni wpływ na różnicowanie się płci, nie sprawdził się w przypadku innych roślin. Geny homologiczne względem *TASSELSEED2*- wyizolowane z *Silene latifolia* (fragment *STA1*) oraz obecna u *Arabidopsis thaliana* sekwencja *ATA*, nie spełniają związanych z nimi oczekiwań. Obszar, w którym występuje ekspresja obydwu genów ogranicza się do komórek tapetum, tkanki wyścielającej ścianę pylników; natomiast w tkankach żeńskich nie zaobserwowano żadnych sygnałów, które mogłyby poświadczyć ich aktywność transkrypcyjną (16).

U niektórych gatunków roślin dwupiennych obserwuje się dużą zmienność pod względem stabilności zachowania płci. Może to być rezultatem niezdolności do pełnej kontroli płci wobec czynników środowiska, bądź też korzyści adaptacyjnych, jaką tego rodzaju niestabilność przynosi danej populacji. W tym ostatnim przypadku środowisko sprawowałoby kontrolę nad ekspresją genów określających fenotyp płci, poprzez zmianę długości dnia lub temperatury otoczenia. Klasycznego przykładu opisywanego zjawiska dostarcza *Mercurialis annua* (szczyr roczny), który tworzy trzy typy populacji: pierwszą, złożoną z osobników o kwiatach doskonałych i kwiatach męskich; drugą, o kwiatach obupłciowych i żeńskich; oraz trzecią, o trzech fenotypach płci. Która z tych populacji będzie dominowała, zależy od lokalnych warunków klimatycznych, czego potwierdzeniem jest nieprzypadkowe rozmieszczenie populacji wszystkich trzech typów w obrębie kontynentu europejskiego (17). Analiza mechanizmów gene-

tycznych odpowiedzialnych za różnicowanie płci u *Mercurialis annua* wskazuje na istnienie trzech odrębnych loci, A, B1 i B2, z kombinacją dwóch alternatywnych alleli w obrębie każdego z nich. Sekwencje, o których mowa, biorą aktywny udział w regulacji poziomu auksyny i cytokininy; ponieważ u tego gatunku regulacja płci zachodzi na drodze modyfikacji szlaku biosyntezy fitohormonów. Fenotypowa ekspresja płci u *Mercurialis* wykazuje dużą zależność względem obydwu regulatorów wzrostu: w wyniku stymulacji szczyru egzogennymi auksynami można zaindukować maskulinizację kwiatów żeńskich, a efekt odwrotny wywołać działaniem cytokininą. Okazało się, że trans-zeatyna, związek należący do grupy cytokinin, gromadzi się w znacznych ilościach w organach żeńskich, podczas gdy w organach męskich nie stwierdzono śladów obecności tej substancji w formie niezwiązanej. Odwrotna zależność zachodzi w przypadku IAA, występującego w stężeniu trzy do sześciu razy wyższym w kwiatach męskich (18). Niezależnie od tego, że wpływ stężenia cytokininy w stosunku do auksyny na determinację płci u *Mercurialis* nie podlega już dzisiaj dyskusji, mechanizm na którym opiera się wzajemna interakcja między determinującymi płęć loci A, B1 i B2, a bodźcami ze strony środowiska wciąż nie został bliżej poznany. Chociaż konwersję kwiatów żeńskich do męskich na drodze stymulacji cytokininami zdołano również wywołać w przypadku *Asparagus officinalis*, to jednak przeważająca liczba gatunków dwupiennych wykazuje znacznie niższą podatność systemu płciowego na działanie związków hormonalnych. W przypadku *Rumex acetosa* i *Silene latifolia* genetyczne czynniki warunkujące określoną płęć są stosunkowo stabilne; a zjawisko konwersji kwiatów pod wpływem stymulacji fitohormonami nie zostało potwierdzone ani w przypadku *Rumex acetosa*, ani spokrewnionego z nim *Rumex acetosella* (19). Podobne rezultaty dał eksperyment z *Silene latifolia*, chociaż stabilność systemu kontrolującego płęć osobników tego gatunku może zostać zachwiana pod wpływem infekcji grzybem *Ustilago violacea*, którego metabolity indukują rozwój zmutowanych pręcików w kwiatach żeńskich; a zainfekowanie osobników męskich może skutkować dodatkowym rozwojem słupkowiec w obrębie kwiatów męskich (20).

U gatunków z rodzaju *Humulus* oraz *Cannabis* (konopie) system odpowiedzialny za ekspresję określonej płci, jak się wydaje, jest mało stabilny, pomimo obecności chromosomów płci. Przypadki występowania roślin jednopiennych w obrębie populacji *Humulus* nie należą do rzadkości, częsty jest rozwój kwiatów żeńskich w wierzchołkowych partiach męskich kwiatostanów. Co więcej, udało się eksperymentalnie wywołać konwersję organów generatywnych u osobników żeńskich, na drodze stymulacji syntetyczną auksyną. Natomiast w rodzaju *Cannabis* auksyny i etylen wywierały efekt feminizujący, podczas gdy maskulinizację organów generatywnych warunkował wpływ cytokinin i gibereliny. W przypadku innych gatunków dwupiennych, takich jak *Maclura pommifera* (żółtnica pomarańczowa) i *Morus rubra* (morwa czerwona) w procesie determinacji płci znaczną rolę odgrywały fitoestrogeny (21).

Prawdopodobnie wszystkie gatunki roślin kwiatowych wyposażone są w zestaw genów niezbędnych w rozwoju kwiatów doskonałych (np. MADS-box), jednak w przypadku roślin dwupiennych rozwój pręcików lub słupków ulega wtórnemu za-

hamowaniu na skutek „kaskadowej” ekspresji genów determinujących płęć, o ile proces ten nie jest regulowany niezależnie od genów homeotycznych. Chociaż dychotomia płci u roślin dwupiennych każdorazowo jest rezultatem blokowania dalszego rozwoju organów płci przeciwnej, to reakcja ta zachodzi na różnych etapach. W obrębie roślin dwupiennych, do których należą *Mercurialis annua*, *Cannabis sativa*, *Spinacia oleracea* oraz rodzaj *Humulus*, rozejście się dróg rozwojowych kwiatów męskich i żeńskich następuje wyjątkowo wcześnie, o czym świadczy brak oznak zawiązywania się alternatywnych organów. Reprezentantów tej grupy łączy jedna charakterystyczna cecha: kwiaty męskie są zbliżone pokrojem do kwiatów obupłciowych, podczas gdy fenotyp kwiatów żeńskich zdecydowanie się od nich różni (22).

W kwiatach większości gatunków dwupiennych stwierdzono inicjację zawiązków organów generatywnych obydwu płci, przy czym rozwój jednej z nich zostaje na pewnym etapie zahamowany, co udokumentowano dla *Silene latifolia*, *Rumex acetosa* i *Pistacia vera*. Jedynie u nielicznych gatunków moment ‘rozejścia się’ obu płci jest tak opóźniony w czasie, że kwiaty męskie i żeńskie nie tylko nie różnią się od siebie nawzajem, lecz nie różnią się także od kwiatów obupłciowych; np. u *Actinidia deliciosa* i *Asparagus officinalis* (23).

Oprócz dystansu czasowego między porą różnicowania się płci u kwiatów dwupiennych, stwierdzono także zróżnicowanie dróg, na których dochodzi do sterylności organów płci przeciwnej; mamy zatem do czynienia z programowaną śmiercią komórek u *Asparagus officinalis* i *Actinidia deliciosa*, podczas gdy u *Rumex acetosa* i *Silene latifolia* komórki eliminowanych organów pozostają nieuszkodzone. U *Silene latifolia* stwierdzono, że zapobieganie dojrzewaniu pręcików w kwiatach żeńskich odbywa się poprzez ‘parenchymatyzację’ komórek (24).

Eksperymentalne traktowanie korzeni *Alium cepa* i *Melandrium noctiflorum* ekstraktem wyizolowanym z męskich organów płciowych *Chara tomentosa* spowodowało niemal całkowite zahamowanie podziałów komórkowych w fazie G1 lub G2 (25). Na podstawie tych danych sugeruje się, że w przypadku roślin dwupiennych, których sterylne organy nie uległy zniszczeniu (*Rumex acetosa*, *Silene latifolia*), za procesy związane z determinacją płci odpowiadają geny związane z regulacją cyklu komórkowego. Analogiczna sytuacja dotyczy gatunków eliminujących organy jednej z płci poprzez programowaną śmierć komórki (PCD). Niewykluczone, że geny determinujące płęć uczestniczą również w szlaku regulacji odpowiadającej za procesy związane z programowaną śmiercią komórek.

4. Chromosomy płci

U nielicznych gatunków przejście od hermafrodytyzmu do dwupienności było następstwem obecności wyspecjalizowanych chromosomów płci, które wyewoluowały prawdopodobnie na skutek ograniczenia rekombinacji między nowo powstałymi, zmutowanymi genami, odpowiadającymi za sterylność żeńskich organów ge-

neratywnych w kwiatach męskich i sterylność pręcikowia w kwiatach żeńskich. Strategia ta zapobiegała powstaniu zrekombinowanego potomstwa o kwiatach obupłciowych, bądź też pozbawionych organów generatywnych, a przy tym gwarantowała wytwarzanie we wzajemnej proporcji liczbowej osobników o kwiatach wyłącznie męskich lub tylko żeńskich. Wymianę genów między chromosomami płci, jak się okazało, uniemożliwiała akumulacja inwersji wewnątrz materiału genetycznego jednego z homologów.

Mechanizmy odpowiedzialne za chromosomowe dziedziczenie płci są podobne w świecie roślin i zwierząt. U większości zbadanych roślin stwierdzono występowanie homozygot XX o kwiatach żeńskich oraz heterozygotycznych osobników XY o kwiatach męskich, zdolnych do produkowania męskich gamet. O męskiej heterozygotyczności świadczy znane od dawna zjawisko sporadycznego pojawiania się owoców u osobników wykształcających kwiaty pręcikowe, co wskazuje na ich potencjalną zdolność do samozapylenia. Jedynym znanym wyjątkiem od tej reguły jest *Fragaria elatior*, u której heterozygotami nie są osobniki męskie, lecz żeńskie.

Wśród sekwencji genów w obrębie męskich chromosomów płci można wyodrębnić trzy uniwersalne klasy: pierwszą, obejmującą grupę aktywnych i rzadko duplikowanych sekwencji, posiadających homologiczne miejsca na terenie chromosomu X; drugą, o genach powielonych w wielu kopiach i pozbawionych swych funkcjonalnych homologów, oraz trzecią, nie odpowiadającą żadnemu z dwóch wymienionych profilów.

Stosunkowo młody wiek chromosomów płci u roślin dwupiennych, czyni je szczególnie użytecznym obiektem badań nad wczesnym etapem procesów, które odpowiadają za obecną strukturę męskiego chromosomu Y. Dostępność blisko spokrewnionych gatunków roślin, których chromosomy mają skład genowy bardziej lub mniej zbliżony do genotypu wspólnego przodka, umożliwia prześledzenie kolejnych etapów ewolucji grup genów, które odpowiadają za rozwój organów generatywnych.

Nie podlega dyskusji fakt, że każdy region zawierający loci odpowiedzialne za determinację płci, pierwotnie posiadał odpowiadającą mu sekwencję w obrębie chromosomu homologicznego, stąd tak istotne jest badanie stopnia homologii między sekwencjami obydwu chromosomów płci u roślin dwupiennych. Niestety, nadal wielu markerów genetycznych związanych z chromosomami X i Y nie zidentyfikowano, co uniemożliwia określenie, jaka ilość loci położonych na żeńskim chromosomie płci posiada homologiczne sekwencje w obrębie chromosomu Y, a jaka takich miejsc nie posiada. Izolacja DNA specyficznego dla kwiatów męskich nie doprowadziła do odkrycia genów determinujących płć u badanych gatunków, co może być spowodowane faktem, że ustalenie się płci ma miejsce już na bardzo wczesnym etapie rozwoju organów generatywnych. Ekspresja wyizolowanych i specyficznych dla danej płci genów jest, jak się wydaje, efektem wtórnym, który niewiele może nam powiedzieć o zachodzących wcześniej mechanizmach odpowiedzialnych za uaktywnienie właściwego 'przełącznika' molekularnego.

Wówczas gdy wyodrębnienie chromosomów płci od pozostałych struktur autosomalnych sprawia trudności, wniosek o ich obecności- lub o ich braku w genomie rośliny, można oprzeć na podstawie obliczeń genetycznych. Wykrycie specyficznych sekwencji DNA występujących wyłącznie u osobników męskich, może świadczyć o obecności heterochromosomów, których nie zidentyfikowano przy użyciu metod cytologicznych, lub o istnieniu określonego genu autosomalnego, odpowiedzialnego za wykształcenie się cech męskich. Prawdopodobieństwo obecności heterochromosomów uznano w przypadku *Hippophaë rhamnoides*, *Dioscorea tokoro*, *Carica papaya*, *Asparagus* i *Actinidia*. Rozwiązanie alternatywne, w którym zakłada się usytuowanie pojedynczego loci w obrębie homologicznej pary chromosomów przyjęto dla *Atriplex garettii*. 'Ewidentne' chromosomy płci zdołano stwierdzić tylko w przypadku sześciu rodzin, reprezentujących osiem gatunków. W rodzinie *Cannabidaceae*, jedynie trzy gatunki *Humulus lupulus*, *H. japonicus* i *Cannabis sativa* odznaczają się dwupiennością, przy czym płęć ustalana jest we wszystkich trzech przypadkach na podstawie proporcji, jaka występuje między liczbą chromosomów X i autosomów. Na uwagę zasługuje fakt, że u przedstawicieli gatunku *H. lupulus* ($2n = 20$) chromosom żeński przewyższa rozmiarami swój męski odpowiednik, co stanowi odstępstwo od obserwowanej powszechnie reguły (25).

W rodzinie *Cucurbitaceae* zjawisko dwupienności występuje u kilku gatunków, lecz tylko u jednego z nich (*Coccinia indica*) stwierdzono w pełni wykształcone chromosomy płci X i Y. W rodzinie *Loranthaceae* do dwupiennych należą gatunki *Viscum*, o chromosomach podlegających różnego typu rearanżacjom materiału genetycznego, odpowiedzialnych za wykształcanie się płci. *Phoenix dactylifera* jako jeden z przedstawicieli rodziny palm odznaczający się dwupiennością, posiada chromosomy płci, przypuszczalnie typu XX / XY (23).

Sekcja *Acetosa* wewnątrz rodzaju *Rumex* (*Polygonaceae*) liczy ponad dziesięć gatunków o systemie determinacji płci podobnym do stwierdzonego u *Drosophila* i *Caenorhabditis elegans*, (opartego na stosunku liczby chromosomów X względem autosomów). Osobniki żeńskie posiadają genotyp XX, natomiast męskie- XY_1Y_2 ($2n = 14$ i $2n = 15$); rośliny diploidalne o genotypach XXY i XXY_1Y_2 wytwarzają kwiaty żeńskie. W przypadku poliploidów o płci roślin decyduje wspomniana proporcja chromosomów X w stosunku do liczby chromosomów autosomalnych. Jeżeli wynosi ona 1,0 lub więcej, wówczas wykształca się roślina o kwiatach żeńskich, natomiast przy proporcji równej 0,5 lub mniejszej – osobnik męski. Inna możliwość dotyczy wartości pośrednich między 0,5 a 1,0 i odpowiada za powstanie fenotypu o kwiatach obupłciowych (26). Obecność lub brak chromosomu Y nie wpływa na ekspresję fenotypu płci, jest to bowiem struktura znacznie zdegenerowana, na co wskazuje spiralizacja chromatyny, widoczna podczas interfazy. Prawdopodobnie jednak obecność chromosomu Y zapewnia prawidłowy przebieg segregacji chromosomów w mejozie. Wprawdzie eksperymenty polegające na trawieniu chromosomu Y DNazą ujawniły sygnały świadczące o jego transkrypcyjnej aktywności (26), jednak mogły one pochodzić z obszarów zajmowanych przez powtarzalne sekwencje DNA

o charakterze transpozonów, rozproszone na terenie chromosomu. Na korzyść tej ostatniej możliwości dodatkowo przemawiają zarówno wysoka częstotliwość występowania różnego typu rearanżacji w materiale genetycznym u *Rumex*, jak i zakres różnorodności morfologicznej chromosomu Y. U *R. hastatulus*, którego system chromosomów płci rozwinął się niezależnie od modelu typowego dla sekcji *Acetosa*, w ekspresję fenotypu płci zaangażowane są obydwa chromosomy płciowe. Fakt, że niektóre spośród mutacji w obrębie chromosomu X nie są maskowane u męskich przedstawicieli tego gatunku dowodzi, iż są one homozygotami, przynajmniej wobec genów, w których zachodzi określona mutacja (27).

Gatunki *Silene latifolia* (bniec biały) i *S. dioica* (bniec czerwony), które ze względu na duży stopień pokrewieństwa mogą wytwarzać płodne hybrydy międzygatunkowe, są jedynymi gatunkami w obrębie liczącego 500 gatunków rodzaju *Silene*, które posiadają chromosomy płci (męski Y i żeński X). Chromosomy płci w rodzinie *Caryophyllaceae* zostały najlepiej zbadane właśnie u *S. latifolia*. U tego gatunku, pomimo wczesnego rozwoju słupkowiec w kwiatach męskich, jak i pręcikowiec w żeńskich, rozwój tych struktur dość szybko podlega zahamowaniu, co daje kwiaty funkcjonalnie jednopłciowe (28). W skład genomu u *Silene* wchodzi podwójny garnitur jedenastu autosomów oraz dwa, wyróżniające się pod względem wielkości, chromosomy płci. Osobniki męskie zawierają submetacentryczny chromosom X i metacentryczny chromosom Y, żeńskie natomiast odznaczają się parą submetacentrycznych chromosomów X. Niezależnie od stopnia ploidalności danej rośliny, wykształcenie cech męskich uwarunkowane jest obecnością przynajmniej jednej kopii chromosomu Y. Interesujący jest fakt, czynnościowej dezaktywacji jednego z dwóch żeńskich chromosomów płci, która – podobnie jak ma to miejsce w przypadku człowieka – dokonuje się na drodze hipermetylacji DNA (29,30).

Analiza następstw delecji w obrębie chromosomu Y u *S. latifolia* oraz *S. dioica* wykazała, że w chromosomie płci męskiej można wyróżnić trzy funkcjonalne regiony: odpowiedzialną za sterylizację organów żeńskich sekwencję Su^F oraz dwie pozostałe: M_1 i M_7 , odpowiadające za wczesny i późny rozwój kwiatów męskich. Oczywiście, żaden z trzech wymienionych regionów nie wywiera pozytywnego wpływu na rozwój żeńskich organów reprodukcyjnych, ponieważ wszystkie geny zaangażowane w ten proces, zlokalizowane są na terenie chromosomów X oraz autosomów. Stosując inne kryteria podziału, w chromosomie Y wyróżniono specyficzny NPR (ang. *Non Pairing Region*) oraz mniejszy, pseudoautosomalny region PAR, zlokalizowany na wierzchołku ramienia q. Rekombinacja między chromosomami płci ograniczała się jedynie do drugiego, wymienionego obszaru (31). Badanie kariotypu *S. latifolia* daje wgląd we wczesne etapy ewolucji chromosomów płci, które rozeszły się stosunkowo niedawno. Trudno w tym przypadku mówić o funkcjonalnym zintegrowaniu chromosomu Y jako całości, bowiem można na nim wyróżnić wyłącznie geny z klasy pierwszej (tzn. posiadające homologiczne odcinki w obrębie chromosomu X). Wprawdzie cytogenetyczne i molekularne analizy przeprowadzone na hermafrodytycznych i aseksualnych mutantach z delecjami wewnątrz chromosomu Y

sugerują obecność przynajmniej trzech zlokalizowanych w jego obrębie genów, które są zaangażowane w różnicowanie i rozwój męskich organów płciowych, jednak dowiedziono, że spośród wszystkich genów ulegających specyficznej ekspresji w kwiatach męskich *S. latifolia* (>50) zaledwie dwa są potencjalnie zlokalizowane w rejonie męskiego chromosomu płci (32).

W odróżnieniu od genomu człowieka, chromosom płci u męskich przedstawicieli *S. latifolia* znajduje się na stosunkowo wczesnym etapie degradacji. W przeprowadzonych eksperymentach z użyciem techniki C-banding połączonej z analizą stopnia metylacji wykazano, że struktura chromosomu Y jest w głównej mierze euchromatyczna, z wyjątkiem centromerycznego i subtelomerycznego DNA (24,30). Zawiera on stosunkowo wiele aktywnych genów, mimo że przytoczone wyniki są przejawem działalności transpozonów. Procesy, które zachodziły w trakcie ewolucji męskiego chromosomu płci u *S. latifolia* i *S. dioica* nie ograniczyły jego wielkości: przeciwnie, jest on znacznie dłuższy od swojego żeńskiego homologa. Przyczyną tego, jak się zakłada, jest nagromadzenie znacznych ilości powtarzalnych sekwencji DNA. Za funkcjonalną degradacją chromosomu Y przemawia fakt, że nie stwierdzono potomstwa osobników o genotypie YY, nie stwierdzono również istnienia androgynicznych haploidów o pojedynczym chromosomie Y (30). Zachwianie proporcji płci na korzyść osobników żeńskich w populacjach *S. latifolia* i *Rumex acetosa*, jak również u innych gatunków, wiąże się z faktem, że nasiona zawierające zarodki z chromosomem Y kiełkują wolniej i rozwijają się słabiej, niż nasiona z zarodkiem posiadającym parę chromosomów X. Wskazuje to na częściową utratę funkcjonalności genów leżących w obrębie chromosomu Y. Argumentu, przemawiającego za degeneracją chromosomu Y u dwupiennych przedstawicieli rodzaju *Silene* dostarczyły wyniki pomiarów zmienności leżącej w jego obrębie sekwencji *SIY1&4* względem homologicznych fragmentów na chromosomie X (*SIX1&4*). Na podstawie tych wyników wykazano, że w przypadku sekwencji *SIY1* obserwuje się mniejsze zróżnicowanie niż w przypadku homologicznego genu *SIX1*, co może świadczyć o postępującej degeneracji chromosomu męskiego w obrębie badanego regionu (33).

5. Markery płci u *Salix viminalis*

Plantacje *Salix viminalis* złożone z męskich osobników przynoszą wyższe plony mierzone wielkością przyrostu suchej masy drewna. Ponieważ u dwupiennych roślin wieloletnich trudno określić płeć osobnika w okresie poprzedzającym jego reprodukcyjną dojrzałość (co trwa 5-10 lat), stosunek płci w nowo zakładanych uprawach wierzbowych ma charakter losowy. W przyszłości planowa gospodarka w monokulturach wierzbowych zostanie oparta na znajomości sekwencji genomowych określonej płci i odpowiedni dobór sadzonek. Metoda regulacji hormonalnej w sterowaniu płcią w przypadku wierzbowych czy topoli nie znajduje zastosowania; bowiem ich trwałe dymorfizm płciowy wykazuje stałą segregację płci, niezależnie od stymulacji związka-

mi chemicznymi typu fitohormonów. Choć w populacjach *Salix* sp. lub *Populus* sp. odnotowano odchylenia w segregacji płci na korzyść osobników żeńskich, a nawet sporadyczne pojawianie się osobników o kwiatach obupłciowych, to zmiany te, są przejawem czynników dziedzicznych, nie abiotycznych.

U dwupiennych przedstawicieli rodziny Salicaceae mechanizmy regulujące rozwój określonej płci nie zostały poznane, a badania hybrydów *Populus trichocarpa* × *Populus deltoides* nie dostarczyły dowodów na istnienie u topoli wyodrębnionych chromosomów płci. Stwierdzono również, że u *Salix viminalis* ($2n = 38$) nie występują heterochromosomy (34). W zaproponowanym roboczym modelu dziedziczenia płci, założono istnienie dwóch genów współdziałających ze sobą epistatycznie, posiadających po cztery allele, przy czym locus hipostatyczny zawiera allele $m1$ i $m2$ warunkujące rozwój cech męskich oraz dwa inne, $f1$ i $f2$, które stymulują rozwój kwiatów żeńskich. Niektóre z tych alleli mogą tłumić fenotypowy przejaw innych alleli, zwłaszcza wobec zaistniałej hierarchii: $f1 > m1 > f2 > m2$. Drugi locus, częściowo epistatyczny względem poprzedniego; zawiera allele $S1$, $S2$, $S3$ i $S4$, których genotypy $__S1S1$, $__S1S2$ i $__S1S3$ są recesywne w stosunku do pierwszego locus. Z kolei genotypy $__S1S4$, $__S2S2$, $__S2S3$, $__S3S3$ i $__S2S4$ dają potomstwo żeńskie, niezależnie od pozostałego układu alleli, natomiast genotypy $__S3S4$ i $__S4S4$ powodują wykształcenie się cech męskich (34). Model ten stanowi jedną z kilku propozycji wyjaśniających odchylenia w dziedziczeniu płci u wierzby.

Badania z zastosowaniem metod BSA (ang. *Bulked Segregant Analysis*) i RAPD umożliwiły wyodrębnienie dwóch genetycznych markerów oskrzydlaających rejon SDL-II, odpowiedzialny za wykształcenie organów żeńskich w kwiatach wierzby. Używając 380 przypadkowo dobranych, 10-nukleotydowych starterów, z których 354 dało określone produkty w postaci namnożonych sekwencji DNA, 285 z nich namnażało średnio 3,8 sekwencji, co dało w przybliżeniu 1080 polimorficznych fragmentów DNA. Na tak wielką liczbę sekwencji tylko jeden marker, UBC 354₅₆₀, (5'-CTAGAGGCCG -3' i około 560 bp), był ściśle związany z loci determinującym płeć u wierzby. Ponieważ wśród losowego tysiąca sekwencji RAPD (średnio 57 sekwencji na każdy chromosom) zidentyfikowano tylko jeden marker jednoznacznie określający płeć osobnika, można przypuszczać, że rejon chromosomalny kontrolujący różnicowanie płci u wierzby skupia niewielką liczbę genów lub też zajmuje stosunkowo małą powierzchnię (33). Dane te poddają w wątpliwość istnienie wyróżnianych (zaawansowanych ewolucyjnie) chromosomów płci u *Salix viminalis* przy założeniu, że istnieje związek między markerem UBC 354₅₆₀ a rejonem zlokalizowanym w obrębie jednego z autosomów, co determinuje wykształcenie się u danego osobnika cech żeńskich. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów, autorzy tego modelu zakładając istnienie dwóch, oddziałujących ze sobą epistatycznie loci, wprowadzili drobne, lecz niezbędne korekty. Dla większej przejrzystości obydwu wspomnianych loci oznaczono A i B , a poszczególne allele dla każdego z nich oznaczono odpowiednio $A1$, $A2$, $A3$, $A4$ oraz $B1$, $B2$, $B3$, $B4$, przy czym allel $A1$ koresponduje z miejscem, do którego wiąże się interesujący nas marker UBC 354₅₆₀. Pomie-

dzy loci *A* i *B* zachodzą następujące interakcje: genotypy $_ _ B1B1$ i $_ _ B3B3$ dają potomstwo żeńskie, natomiast kombinacje alleli $_ _ B1B3$ i $_ _ B4B4$ osobniki męskie. Genotyp $_ _ B1B2$ odpowiada za cechy żeńskie, z wyjątkiem dwóch wariantów: *A2A4B1B2* i *A3A4B1B2*, stymulujących rozwój cech męskich. Osobniki posiadające genotyp $_ _ B1B4$ wykształcają kwiaty żeńskie, z wyjątkiem układu: *A1A3B1B4*. Genotyp $_ _ B2B3$ również daje płęć żeńską, lecz w tym przypadku występują pewne odstępstwa od reguły w postaci wariantów *A2A4B2B3* i *A3A3B2B3*. U osobników z genotypem $_ _ B2B4$ wykształcają się cechy żeńskie, wyjąwszy kombinację *A3A4B2B4*. Z kolei genotypy $_ _ B2B2$ dają okazy o kwiatach męskich, z wyjątkiem dwu układów alleli: *A1_ B2B2* i *A2_ B2B2*. Z pozostałych czterech wariantów dwa: *A1A2B3B4* i *A1A3B3B4* stymulują rozwój kwiatów męskich, natomiast dwa pozostałe: *A2A3B3B4* i *A3A3B3B4* żeńskich. W związku z drobnymi odchyleniami w oczekiwanej proporcji płci u potomstwa mieszańcowego, istnieje konieczność wprowadzenia dalszych poprawek do tak zmodyfikowanego modelu, ze względu na obecność aktywnych genów cytoplazmatycznych, wywierających wpływ na ekspresję genów jądra komórkowego we wczesnym etapie zarodkowym (34).

Na podstawie średniej częstotliwości, z jaką zachodzi zjawisko *crossing-over* między interesującymi nas genami oszacowano wstępnie, że odległość dzieląca na mapie odpowiedniego chromosomu marker UBC 354₅₆₀ od loci determinującego płęć u wierzby (*SDL-II*) może wynosić około 1,6-1,1 cM. Biorąc pod uwagę bliskie pokrewieństwo taksonomiczne między rodzajami *Salix* sp. i *Populus* sp., wyrażające się m.in. jednakową liczbą chromosomów ($1n = 19$) oraz wiedząc, że dystans jednostkowy na mapie chromosomowej u topoli wynosi średnio 180 kb/cM ocenia się, że UBC 354₅₆₀ oddalony jest od jednego z dwóch loci determinujących płęć u *Salix viminalis* przynajmniej o około 260 kb (33). Drugi spośród zidentyfikowanych markerów płci wierzby, OPAE08₁₃₀₀, został wyodrębniony przy zastosowaniu metod, używanych podczas identyfikacji polimorficznego fragmentu UBC 354₅₆₀. Także w tym przypadku liczba starterów użytych w reakcji RAPD oscylowała w granicach tysiąca (953), z czego 773 wykorzystano w amplifikacji określonych sekwencji genomowych. Jedynym fragmentem segregującym ściśle według kryteriów wymaganych dla loci związanych z płcią wierzby był mierzący niespełna 1,3 kb produkt startera o nazwie AE08. Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę porównawczą obydwu interesujących nas fragmentów:

Sekwencja DNA pochodząca z klonowanego fragmentu RAPD UBC354₅₆₀ miała długość równą w przybliżeniu 549 bp i zawierała 42,4% G + C (A = 190; C = 84; G = 149; T = 126). 20-nukleotydowy przedni odcinek starterowy (5'-GAGAGGGA-GGGAGATTTAAG-3') oraz drugi, 22-nukleotydowy i zamieszczony z przeciwnej strony (5'-CGCCGTAGCAGATTGTTAATCAC-3'), wykorzystano w celu uzyskania ostatecznego produktu- 520-bp markera DNA oznaczonego jako SCAR UBC354₅₆₀. W przypadku polimorficznego fragmentu RAPD OPAE08₁₃₀₀ łączna ilość zawartego tu RNA mierzyła 1271 bp, a łączny stosunek par zasad G + C wynosił 27,9% (A = 478; C = 163; G = 191; T = 439). W wyniku sekwencjonowania tego materiału wyselek-

cjonowano z niego 20-nukleotydowy starter (5'-TGGTTAGGTGTCGTGATGGA-3') oraz odpowiadający mu odcinek o tej samej liczbie nukleotydów zamieszczony po przeciwnej stronie sekwencji RAPD (5'-CAATCCACAATGCTTTTGA-3'), które wykorzystano w celu amplifikacji 780-kb ostatecznego produktu – markerowego odcinka DNA nazwanego SCAR OPAE08₇₈₀ (35).

W badaniach przeprowadzonych na różnych klonach *Salix viminalis* stwierdzono, że obydwa wymienione markery SCAR wykazują dla fenotypów płci u wierzby segregację w stosunku 1:1, przy niewielkich tylko odchyleniach (34). Na podstawie średniej częstotliwości, z jaką zachodziła rekombinacja między interesującymi nas sekwencjami DNA udało się z dużym prawdopodobieństwem wyliczyć zarówno dystans oddzielający obydwa markery SCAR, jak również odległość, od determinującego płęć loci SDL-II. Wstępne oszacowania wskazują, że SCAR UBC354₅₂₀ leży w odległości 2,7-1,5 cM względem SDL-II, czyli nieco bliżej niż SCAR OPAE08₇₈₀, który jest od niego oddalony o około 3,3-1,9 cM. Dystans dzielący obydwa markery „oskrzydłające” locus SDL-II wynosi 4,4-2,1 cM (35).

Chociaż podstawowa liczba chromosomów ($n = 19$) u rodzaju *Salix* jest identyczna jak u *Populus* – niezależnie od faktu, że wykazuje ona w rodzinie *Salicaceae* silne tendencje do ploidyzacji – to jednak zawartość DNA u diploidalnej wierzby waha się w granicach 0,76-0,98 pg, co stanowi znacznie mniejszą ilość niż 1,2-1,3 pg ilości DNA u topoli. Na podstawie średniej wartości jednostki mapowej 180 Kb/cM dla gatunku *Populus trichocarpa* szacuje się, że obydwa markery SCAR dzieli odległość mieszcząca się w zakresie 414-1170 kb. Jest to rozpiętość zbyt duża dla zastosowania metody zwanej „chodzeniem po chromosomie”, dlatego metodyczne ustalanie sekwencji kolejnych markerów SCAR, które leżą w obrębie loci SDL-II jest mało możliwe do zrealizowania (35).

Odkrycie molekularnych markerów związanych z rozwojem osobników o kwiatach żeńskich u *Salix viminalis* przemawia na korzyść hipotezy, że determinacja płci u wierzby zachodzi przy udziale jednego lub też większej liczby loci zlokalizowanych w obrębie autosomów. Związek molekularnych markerów z rozwojem organów generatywnych żeńskich mógłby sugerować dwie możliwości: dziedziczenie odpowiednich sekwencji DNA wraz z męskim chromosomem płci lub też ścisły związek z genem determinującym rozwój żeńskich cech. Fakt, że w liczbie starterów, która przekraczała dwa tysiące, znalazły się tylko dwa, u których wykazano ścisłą zależność od płci osobnika daje mocny argument przemawiający za brakiem chromosomów płci u przedstawicieli rodziny *Salicaceae*. Udało się ponadto wykazać, że obydwa markery płci mogą być dziedziczone zarówno drogą ojcowską jak i mateczną.

6. Podsumowanie

Wśród 240 000 gatunków okrytonasiennych gatunki dwupienne stanowią tylko 6%. Dwupienność przejawia się z niejednakową częstotliwością w rodzinach takich

jak: *Menispermaceae*, *Myristicaceae*, *Euphorbiaceae*, *Moraceae*, *Cucurbitaceae*, *Anacardiaceae* i *Urticaceae*, wykazując wyższą frekwencję u dwuliściennych niż u jednoliściennych, co koreluje z cechą wieloletniego przyrostu, wiatropylnością czy zapłodnieniem przy udziale wody, powszechnym wśród gatunków klimatu tropikalnego. Badania nad dwupiennością ograniczają się głównie do gatunków, które mają szczególne znaczenie dla gospodarki: (*Asparagus officinalis*, *Rubus chamaemorus*, *Phoenix dactylifera*, *Cannabis sativa*, *Humulus lupulus*, *Actinidia deliciosa*, *Viscum album*, *Carica papaya*, *Pistacia vera*, *Dioscorea* spp., *Spinacia oleracea*, *Piper longum*, *Hippophaë rhamnoides*, *Salix* spp. i *Populus* spp.). Dlatego poszukiwane są metody wczesnej identyfikacji płci, niezmiernie ważne w przypadku roślin żeńskich, uprawianych dla owoców lub nasion (chmiel zwyczajny, daktylowiec, melonowiec, pochrzyn, drzewo pistacjowe, malina moroszka, rokitnik oraz uprawiana dla owoców kiwi *Actinidia*). Rzadziej faworyzowane są osobniki męskie np. pieprz indyjski, a także topole i wierzby, u których osobniki męskie odznaczają się szybszym wzrostem płonu suchej masy drewna. Opracowane już metody detekcji, a także przyszłe rozwiązania umożliwią pomyślne rozwiązanie licznych zagadnień związanych z dwupiennością.

Praca wykonana w ramach grantu R 1206103 przyznanego przez MNiSW na lata 2008-2010.

Literatura

1. Freeman D. C., Doust J. L., El-Keblawy A., Miglia K. J., McArthur E. D., (1997), *Bot. Rev.*, 63, 65-92.
2. Charlesworth D., Charlesworth B., (1978), *Am. Nat.*, 112, 975-997.
3. Charlesworth D., Guttman D. S., (1999), in: *Sex determination in plants*, Bios Scientific Publishers, Ainsworth C. C., Oxford, 25-49.
4. Lloyd D. G., (1974), *Heredity*, 32, 11-34.
5. Charlesworth D., Charlesworth B., (1979), *Heredity*, 41, 137-154.
6. Kerdelhue C., Rasplus J-Y., (1996), *Oikos*, 77, 163-166.
7. Lloyd D. G., (1979), *Plant Syst. Evol.*, 131, 71-80.
8. Parkinson C. L., Adams K. L., Palmer J. D., (1999), *Current Biol.*, 9, 1485-1488.
9. Cohen E. S., Meyerowitz E., (1991), *Nature*, 353, 31-37.
10. Yanofsky M. F., (1990), *Nature*, 346, 35-39.
11. Schwartz-Sommer Z., Huijser P., Nacken W., Saedler H., Sommer H., (1990), *Science*, 250, 931-936.
12. Hardenack S., Ye D., Saedler H., Grant S., (1994), *Plant Cell*, 6, 1775-1787.
13. Ainsworth C. C., Crossley C., Buchanan-Wollaston V., Thangavelu M., Parker J., (1995), *Plant Cell*, 7, 1583-1598.
14. Shephard H. L., (1999), *Molecular analysis of flower development in hop*, PhD thesis Wye College, University of London.
15. DeLong A., Claderon-Urrea A., Dellaporta S., (1993), *Cell*, 74, 757-768.
16. Lebel-Hardenack S., Ye D., Koutnikova H., Saedler H., Grant S., (1993), *Plant Journal*, 12, 515-526.
17. Pannel J., (1997), *Heredity*, 78, 50-56.
18. Louis J-P., Augur C., Teller G., (1990), *Plant Physiol.*, 94, 1535-1541.
19. Culafic L., (1999), *Russian J. Plant Physiol.*, 46, 566-577.
20. Audran J. C., Batko M., (1981), *Acta Soc. Bot. Pol.*, 50, 29-32.
21. Maier C. G-A., Chapman K. D., Smith D. W., (1997), *Plant Sci.*, 130, 27-40.
22. Lebel-Hardenack S., Grant S. R., (1997), *Trends in Plant Sci.*, 2, 130-135.

23. Ainsworth C., (2000), *Ann. Bot.*, 86, 211-221.
24. Farbos I., Oliveira M., Negrutiu I., Mouras A., (1997), *Sex. Plant Reprod.*, 10,155-167.
25. Westergaard M., (1958), *Adv. Genet.*, 9, 217-281.
26. Clark M. S., Parker J. S., Ainsworth C. C., (1993), *Heredity*, 70, 527-536.
27. Smith B. W., (1963), *Genetics*, 48, 1265-1288.
28. Charlesworth D., (2002), *Heredity*, 88, 94-101.
29. Grabowska-Joachimiak A., Joachimiak A., (2002), *Genome*, 45, 243-252.
30. Donnison I. S., Siroky J., Vyskot B., Saedler H., Grant S. R., (1996), *Genetics*, 144, 1893-1901.
31. Carroll S. B., Mulcahy D. L., (1990), *Am. J. Bot.*, 80, 551-556.
32. Ciupercescu D. D., Veuskens J., Mouras A., Ye D., Briquet M., (1990), *Genome*, 33, 556-562.
33. Desfeux C., Maurice S., Henry J-P., Lejeune B., Gouyon P. H., (1996), *Proc. R. Soc. Lond. ser. B*, 263, 409-414.
34. Alstrom-Rapaport C., Lascoux M., Gullberg U., (1997), *Theor. Appl. Gen.*, 493-497.
35. Gunter L. E., Roberts G. T., Larimer F. W., Tuskan G. A., (2003), *J. Heredity*, 94, 185-189.
36. Soltis P.S., Soltis D.E., Chase M.W., (1999), *Nature*, 402, 402-404.