

## **Zobaczyć gen, chromosom i genom – czyli badania cytogenetyki molekularnej**

### **Cytogenetyka**

Cytogenetyka jest to nauka o chromosomach. Przedmiotem badań klasycznej cytogenetyki jest przede wszystkim zachowanie się chromosomów podczas podziałów komórkowych i ich udział w rekombinacji genów. Współczesna cytogenetyka molekularna obejmuje także lokalizację genów, ale jej główny nurt to badania struktury i funkcji chromosomów również w jądrze niedzielnym się, w czasie interfazy cyklu komórkowego. Chromosomy, struktury zbudowane z liniowej cząsteczki DNA i białek, wyodrębniają się z chromatyny jądra komórkowego w czasie podziału mitotycznego lub mejozytycznego. Każdy gatunek charakteryzuje się określoną liczbą chromosomów różniących się wielkością i morfologią. Zespół chromosomów danego gatunku – to genom. Genomowy DNA składa się z sekwencji kodujących – genów – warunkujących wszystkie właściwości organizmu oraz dużej ilości sekwencji niekodujących, których funkcja nie jest jeszcze w pełni poznana.

Dlaczego badamy chromosomy i zlokalizowane w nich geny? Robimy to, żeby zrozumieć funkcjonowanie organizmów i wykorzystać tę wiedzę w hodowli lepszych odmian roślin, ras zwierząt oraz w wykrywaniu i zapobieganiu chorobom u ludzi [27, 29].

Chromosomy zostały wykryte w połowie XIX wieku przy okazji intensywnych badań bakteriologicznych w poszukiwaniu mikroorganizmów chorobotwórczych, powodujących w tym czasie groźne epidemie. Barwniki stosowane do wykrywania bakterii barwiły również struktury, które pojawiały się w komórkach w czasie podziału. Wilhelm Waldeyer w 1888 roku [32] nazwał je chromosomami. W następnych latach opracowano wiele metod barwienia chromosomów, które umożliwiały określenie ich liczby i morfologii dla wielu gatunków roślin i zwierząt. Aż trudno uwierzyć, że liczba chromosomów człowieka została ustalona dopiero w 1956 roku [30]. Istotnym postępowaniem w badaniach chromosomów było wprowadzenie tzw. barwień różnicowych, w których ujawniane są poprzeczne prążki wzdłuż chromosomu [1]. Układ prążków w chromosomach jest charakterystyczny dla poszczególnych gatunków, a w obrębie genomu dla poszczególnych chromosomów.

Analizę wzoru prążków wykorzystuje się między innymi w diagnostyce medycznej, stała się ona podstawą dynamicznego rozwoju cytogenetyki człowieka.

Rzeczywisty rozwój biologii molekularnej pozwolił na poznanie struktury, funkcji i sposobu przekazywania genów. Dynamiczny rozwój badań molekularnych umożliwił opracowanie szeregu metod inżynierii genetycznej. Jednak przełomowym momentem było poznanie w ostatnich latach całkowitej sekwencji DNA genomu człowieka oraz genomów niektórych gatunków roślin i zwierząt. Badania molekularne prowadzone na materiale genetycznym izolowanym z tkanek, pojedynczych komórek lub frakcji organeli komórkowych, pozwalają na poznanie struktury i funkcji poszczególnych genów, ale nie dostarczają informacji o ich lokalizacji w jądrze i chromosomach. Połączenie metod biologii molekularnej z metodami cytogenetycznymi otworzyło nowe możliwości obserwacji chromosomów, lokalizacji w nich genów i innych sekwencji DNA. Już pod koniec lat 60. opracowano metodę hybrydyzacji kwasów nukleinowych *in situ*, z wykorzystaniem radioaktywnie znakowanych sond [3]. Jednak prawdziwy rozkwit cytogenetyki molekularnej rozpoczął się w latach 80. wraz z wprowadzeniem metody nieradioaktywnej znanej jako FISH, od angielskiej nazwy *Fluorescence In Situ Hybridisation* [14, 22]. Metoda ta polega na łączeniu (hybrydyzacji) sondy molekularnej z komplementarnym DNA w chromosomach lub jądrach interfazowych na preparatach mikroskopowych. Dzięki znakowaniu sondy, najczęściej fluorochromami, miejsca hybrydyzacji mogą być identyfikowane pod mikroskopem i lokalizowane w chromosomach. Ogromną zaletą tej metody jest możliwość stosowania kilku sond jednocześnie, a problem ograniczonej liczby fluorochromów rozwiązuje się, mieszając w różnych proporcjach, jak w malarstwie farby, sondy wyznakowane na różne kolory. W ten sposób otrzymuje się wielobarwne obrazy chromosomów [19]. Ogromny postęp w mikroskopii fluorescencyjnej, komputerowej analizie obrazu i immunocytochemii, równocześnie z postępowaniem w biologii molekularnej, pozwolił na opracowanie wielu modyfikacji metody FISH, pozwalających na wykrywanie coraz krótszych fragmentów DNA i stosowaniu większej liczby sond równocześnie [9].

Metoda hybrydyzacji *in situ* umożliwia lokalizację genów w chromosomach i tworzenie map fizycznych, wykrywanie całych chromosomów lub ich fragmentów, jak również rozróżnianie genomów rodzicielskich w komórkach mieszańców. Właśnie dzięki tym metodom możliwe jest wykrywanie zmian strukturalnych i rearanżacji chromosomowych, które powstają w komórce spontanicznie lub w wyniku działania czynników środowiskowych, zabiegów hodowlanych albo biotechnologicznych. Metody te przyczyniły się do renesansu badań cytogenetycznych, a cytogenetyka molekularna znalazła szerokie zastosowanie w szeregu dziedzinach takich, jak diagnostyka medyczna czy ulepszanie roślin i zwierząt. Szczególnie istotny wkład w poznanie struktury i funkcji genomu mają badania chromosomów organizmów modelowych takich, jak: drożdże, muszka owocowa, mysz, a z roślin *Arabidopsis* i ryż, których genomy są całkowicie

zsekwencjonowane. Porównawcze analizy tych genomów z innymi organizmami pozwoliły lepiej zrozumieć wiele procesów związanych z ewolucją gatunków oraz określić przemiany chromosomowe, jakie zaszły w genomach poszczególnych organizmów.

Aby móc analizować zmiany w genomach różnych gatunków należy poznać strukturę i cechy charakterystyczne dla poszczególnych chromosomów. Chromosomy nie są strukturą homogeną, poszczególne ich odcinki zawierają różne geny lub inne sekwencje DNA. Są trzy typy sekwencji DNA wspólne dla wszystkich chromosomów, decydujące o ich prawidłowym funkcjonowaniu. Jako pierwsze przedstawić można krótkie, wielokrotnie powtórzone sekwencje na końcach chromosomów, tworzące telomery. Telomery, poza tym, że zabezpieczają końce chromosomów, są swoistym zegarem komórki, ponieważ, ulegając skracaniu przy każdym podziale komórki, ograniczają liczbę podziałów. Komórki nowotworowe tym się między innymi różnią od komórek normalnych, że posiadają zdolność odbudowania telomerów i tym samym stają się jakby nieśmiertelne. Drugim niezbędnym do funkcjonowania chromosomu odcinkiem jest tzw. przewężenie pierwotne, zwane centromerem, zawiera ono specyficzne sekwencje DNA, które w połączeniu z odpowiednimi białkami decydują o prawidłowym rozdzieleniu chromosomów do jąder potomnych w czasie podziału. Trzecim typem sekwencji są sekwencje inicjacji replikacji DNA, procesu koniecznego dla podwojenia chromosomów przed ich rozdzieleniem w czasie podziału jądra [27].

Znaczą część chromosomu stanowią sekwencje DNA, które występują w wielu tysiącach kopii, nie są to geny, a ich funkcja nie zawsze jest znana. Mogą występować tandemowo, w blokach albo jako rozproszone sekwencje wzdłuż całych chromosomów. Geny stanowią niewielki procent całkowitej zawartości DNA genomu, często mniej niż 10% [23].

### Lokalizacja genów

W wyniku analizy genetycznej i molekularnej tworzone są coraz dokładniejsze mapy genetyczne chromosomów dla wielu gatunków roślin i zwierząt. Mapy te są wykonywane na podstawie częstotliwości rekombinacji, jaka ma miejsce w mejozie, między genami lub markerami molekularnymi, a odległości między nimi są podawane w jednostkach względnych. Odległości na mapach genetycznych różnią się istotnie od odległości rzeczywistych w chromosomach, co wynika między innymi, z różnej ilości i rozmieszczenia sekwencji niekodujących. Hybrydyzacja DNA-DNA *in situ* pozwala na mapowanie genów bezpośrednio w chromosomach i tworzenie fizycznych map chromosomów. Dzięki możliwości równoczesnego mapowania kilku sekwencji DNA, można obserwować wzajemne ułożenie kilku genów lub genów i innych sekwencji w tym samym chromosomie.

Pierwszymi genami wyizolowanymi i często wykorzystywanymi w badaniach cytogenetycznych są geny rybosomalnego RNA (rRNA) [20]. Są to geny obecne w każdej

komórce i występują w wielu powtórzeniach, a ponieważ występują tandemowo, dają duże sygnały FISH, są więc dobrym markerem chromosomów wykorzystywanym do ich identyfikacji i wykrywania nieprawidłowości [4, 5, 21]. Położenie genów rRNA w chromosomach jest charakterystyczne dla danego gatunku. Analiza porównawcza lokalizacji tych genów u gatunków spokrewnionych może dostarczyć informacji o przemianach chromosomowych w ewolucji badanych gatunków [6].

Większość genów kodujących białka jest obecna w genomie pojedynczo lub w kilku kopiach i częściej w odcinkach dystalnych chromosomów niż przy centromerze. Lokalizacja tych genów jest trudniejsza, gdyż ze względu na krótkie sekwencje DNA sygnały FISH są słabe, mimo to coraz więcej genów jest mapowanych w chromosomach roślin, zwierząt, w tym człowieka. Tworzenie fizycznych map chromosomów człowieka ma szczególne znaczenie ze względu na brak map genetycznych. Znajomość lokalizacji genów warunkujących nieprawidłowy rozwój, wzrost lub określone schorzenia jest ważna w diagnostyce medycznej i terapii. Podobnie u roślin, znajomość lokalizacji genów jest ważna w programach hodowlanych nowych odmian lub poprawiania istniejących. W ostatnich latach ważną rolę odegrało mapowanie na drodze FISH obcych genów wprowadzonych do organizmu w wyniku transformacji. Okazało się, że aktywność tych genów zależy w znacznym stopniu tak od miejsca włączenia do chromosomu, jak i od liczby kopii w chromosomie [24, 25].

### Identyfikacja chromosomów

Identyfikacja chromosomów jest podstawą w badaniach cytogenetycznych, szczególnie u gatunków z małymi, licznymi i słabo zróżnicowanymi chromosomami. Sygnały hybrydyzacji *in situ* z powtarzalnymi sekwencjami DNA mogą dawać wzór charakterystyczny dla poszczególnych chromosomów w genomie badanego gatunku. Jeżeli zastosowanie jednej sondy nie pozwala odróżnić wszystkich chromosomów, stosuje się mieszaninę kilku sekwencji. I tak na przykład sygnały FISH otrzymane po zastosowaniu dwóch powtarzalnych sekwencji DNA pozwalają odróżnić 21 par chromosomów heksaploidalnej pszenicy [26], podobnie identyfikuje się chromosomy u innych gatunków [2, 11, 12]. Stosując do hybrydyzacji *in situ* sekwencje DNA specyficzne dla chromosomu, można identyfikować w genomie pary chromosomów homologicznych tzn. pochodzących od ojca i matki, a następnie uporządkować je według wielkości, tworząc kariogram. Znajomość kariogramu określonego gatunku pozwala wykrywać i analizować aberracje chromosomowe, które mogą być wywołane czynnikami fizycznymi lub chemicznymi, zwanymi ogólnie mutagenami, należą do nich również czynniki rakotwórcze. Aberracje chromosomowe mogą dotyczyć zmiany liczby chromosomów bądź ich struktury. Zmiany strukturalne polegają na utracie, inwersji lub translokacji fragmentu chromosomu, prowadząc do zmiany jego morfologii. Nieprawidłowości w liczbie i struk-

turze chromosomów człowieka są przyczyną wielu chorób nie tylko dziedzicznych, ale i nabytych, w tym licznych nowotworów. Konwencjonalne metody cytogenetyczne pozwalają tylko na określenie częstotliwości aberracji chromosomowych, które w sposób istotny zmieniają morfologię chromosomu, ale nie dają możliwości wykrycia niewielkich zmian szczególnie u gatunków charakteryzujących się małymi chromosomami. Zastosowanie do FISH specyficznych dla chromosomu sond pozwala wykryć nawet niewielkie ubytki lub powtórzenia w chromosomach, jak również zidentyfikować, które chromosomy uległy zmianom [7, 10]. U roślin wykorzystanie metody FISH do analizy chromosomów ograniczone jest liczbą sekwencji DNA dostępnych dla badanego gatunku. Są gatunki takie jak np. *Arabidopsis* lub ryż, dla których dostępne są klony BAC (sztuczne chromosomy bakteryjne) zawierające duże inserty genomowego DNA, ale dla wielu gatunków nie są znane żadne lub tylko nieliczne, specyficzne sekwencje DNA.

Dla chromosomów człowieka dostępne są sondy DNA specyficzne dla każdego chromosomu lub jego fragmentu. DNA taki otrzymuje się z izolowanych chromosomów, następnie amplifikuje i znakuje odpowiednim fluorochromem. Sonda taka użyta do hybrydyzacji *in situ* łączy się z DNA całego chromosomu, „malując” parę chromosomów homologicznych na jeden kolor. Stosując mieszaninę sond, możemy w jednej reakcji pomalować nawet wszystkie chromosomy, każdy na inny kolor. Jeżeli w komórce stwierdzi się tylko jeden lub więcej niż dwa tak samo wybarwionych chromosomów świadczy to o nieprawidłowości w liczbie chromosomów. W komórkach niosących aberracje strukturalne można stwierdzić w jednym chromosomie kilka kolorów, co wskazuje na wymianę lub translokację fragmentów chromosomów. Niektóre zmiany są typowe dla określonych schorzeń lub typów nowotworów, co powoduje, że metoda ta jest szeroko wykorzystywana w diagnostyce medycznej [13, 31].

Przyczyną choroby może być zmiana w chromosomie dotycząca bardzo małego odcinka, dlatego do wykrycia takich zmian stosuje się sondy specyficzne dla ściśle określonego regionu chromosomu. Sondy takie otrzymuje się na drodze wycinania laserem poszczególnych fragmentów chromosomu i ich fluorescencyjnego znakowania. W wyniku FISH z mieszaniną tak otrzymanych sond DNA, specyficznych dla danego chromosomu, otrzymujemy wielobarwne prążkowanie tego chromosomu [31]. Układ tych prążków jest stały, niezależnie od stopnia kondensacji chromosomu. Śledząc dokładnie układ prążków można wykryć ubytki, inwersje lub zwielokrotnienie prążków. W komórkach rakowych często występują równocześnie zmiany zarówno liczby, jak i struktury chromosomów [33]. Podobne badania prowadzi się również w przypadku ludzi narażonych na ryzyko działania czynników kancerogennych, takich jak promieniowanie, metale ciężkie czy inne związki powodujące uszkodzenia chromosomów.

Malowanie chromosomów roślinnych odbywa się na nieco innej zasadzie. U większości roślin DNA otrzymane z izolowanego chromosomu zawiera dużą ilość sekwencji

powtarzalnych i hybrydyzuje z wieloma innymi chromosomami. Ostatnio opracowano metodę, w której stosunkowo małe chromosomy *Arabidopsis thaliana* zostały „malowane” z użyciem sondy zawierającej ponad 100 znakowanych klonów BAC [17]. W ten sposób wizualizowano pięć par chromosomów na różne kolory zarówno w czasie podziału, jak i w jądrze interfazowym. Sondy specyficzne dla *A. thaliana* były też użyte do malowania chromosomów gatunków spokrewnionych, wykazując w nich powtórzenia i rearanżacje fragmentów chromosomów, które miały miejsce w czasie ewolucji tych gatunków [16, 18, 34].

Alternatywną metodą identyfikacji chromosomów jest CSCDM (*Chromosome-Specific Cytogenetic DNA Markers*), polegające na stosowaniu jako sondy klonów zawierających inserty genomowego DNA. W wyniku hybrydyzacji otrzymuje się wzór sygnałów FISH specyficzny dla poszczególnych chromosomów badanego gatunku, umożliwiając ich identyfikację. Metodę tę wykorzystano już w analizie kariotypów wielu gatunków roślin [2, 11, 12].

### Identyfikacja genomów

Większość gatunków roślin jest allopoliploidami tzn., że w ewolucji powstały one w wyniku krzyżowania dwóch gatunków, zawierają więc chromosomy różnego pochodzenia. Przykładem może być pszenica, bawełna, banan, rzepak, tytoń i wiele innych. W programach hodowlanych również wykorzystuje się mieszańce międzygatunkowe oraz linie roślin z chromosomem lub fragmentem chromosomu z korzystniejszymi genami pochodzącym od innego gatunku. Wykorzystując do hybrydyzacji *in situ* całkowity genomowy DNA jednego z rodzicielskich gatunków jako sondę, można wyróżnić chromosomy tego gatunku w genomie mieszańca. Metoda ta znana jako GISH (*Genomic In Situ Hybridization*) stosowana jest z powodzeniem od wielu lat do analizy genomów wielu gatunków roślin. Badania te pozwoliły na ustalenie gatunków ancestralnych dla wielu allopoliploidów oraz wykrycie translokacji międzygenomowych w czasie ewolucji. Dobrze udokumentowane zostały translokacje między genomami ancestralnymi u tytoniu (*Nicotiana tabacum*) [15], owsa (rodzaj *Avena*) [8] i innych. GISH dostarcza cennych informacji o podobieństwach między DNA pokrewnych gatunków i daje nowe możliwości w badaniach filogenetycznych i taksonomicznych.

W cytogenetyce człowieka genomowy DNA izolowany z komórek normalnych i nowotworowych jest stosowany do poszukiwania duplikacji lub delecji w komórkach nowotworowych. W tym celu odmiennie znakowane oba typy genomowego DNA są równocześnie hybrydyzowane do chromosomów prawidłowych komórek. Na podstawie intensywności obu barw wnioskuje się o typie nieprawidłowości. Technika porównawczej hybrydyzacji genomowej – CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) wprowadziła ogromny postęp w ocenie przemian chromosomowych i diagnostyce medycznej [28].

## Podsumowanie

W badaniach cytogenetyki molekularnej, poza omawianą tu metodą FISH i jej różnymi modyfikacjami, ogromną rolę odgrywają inne techniki takie, jak pomiary zawartości DNA z wykorzystaniem cytometru przepływowego, sortowanie chromosomów lub wykorzystanie mikroskopii konfokalnej i analizy trójwymiarowej. Dotychczasowe badania cytogenetyki molekularnej dotyczą głównie lokalizacji DNA, a w badaniach ekspresji genów również RNA. Ostatnio zainteresowania cytogenetyków obejmują również białka wchodzące w skład chromatyny jądrowej, a szczególnie białka histonowe. Stwierdzenie, że w funkcjonowaniu genomu istotną rolę odgrywają procesy epigenetyczne, takie jak modyfikacje chromatyny, dało początek immunochemicznym metodom lokalizacji białek w połączeniu z lokalizacją DNA (Immuno-FISH). Wyniki tych badań dostarczają nowych danych o regulacji funkcji genów, strukturze chromatyny i roli sekwencji niekodujących, ale ciągle jednak pozostaje do wyjaśnienia wiele kwestii podstawowych z zakresu cytogenetyki molekularnej. Jednym z ważnych zagadnień jest tzw. architektura jądra interfazowego. W okresie interfazy chromosomy nie są widoczne, ale jądro komórkowe jest bardzo aktywne, w tym czasie pełni wszystkie najważniejsze funkcje. Ciągle zbyt mało wiemy o sposobie ułożenia chromosomów w jądrze, ich wzajemnych oddziaływaniach i wpływie na ekspresję genów. Malowanie chromosomów, lokalizacja specyficznych sekwencji w połączeniu z obserwacją w mikroskopie konfokalnym i rekonstrukcja struktury trójwymiarowej jądra pozwala na coraz głębszy wgląd do wnętrza jądra komórkowego i wyjaśnianie procesów, jakie tam zachodzą.

## Literatura

- [1] Caspersson T., Farber S., Foley G.E. et al. (1968) *Chemical differentiation along metaphase chromosomes*. Exp. Cell Res. 49, 219-222.
- [2] Dong F., Song J., Naess S.K. et al. (2000) *Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato*. Theor. Appl. Genet. 101, 1001-1007.
- [3] Gall J.G., Pardue M.L. (1969) *Formation and detection RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 63, 378-383.
- [4] Hasterok R., Jenkins G., Langdon et al. (2001) *Ribosomal DNA is an effective marker of Brassica chromosomes*. Theor. Appl. Genet. 103, 486-490.
- [5] Hasterok R., Wolny E., Kulak S. et al. (2005) *Molecular cytogenetic analysis of Brassica rapa-Brassica oleracea var. alboglabra monosomic addition lines*. Theor. Appl. Genet. 107, 196-205.
- [6] Hasterok R., Wolny E., Hosiawa M. et al. (2006) *Comparative Analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of Brassicaceae*. Annals of Botany 97, 205-216.
- [7] Isaka T., Nestor A.L., Takada T., Allison D.C. (2003) *Chromosomal variations within aneuploid cancer lines*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 5, 1343-1353.
- [8] Jellen E.N., Gill B.S., Cox T.S. (1994) *Genome in situ hybridization differentiates between A/D and C genome chromatin and detects intergenomic translocations in polyploid oat species (genus Avena)*. Genome 37, 613-618.

- [9] Jiang J., Gill B. S. (2006) *Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research*. Genome 49, 1057-1068.
- [10] Juchimiuk J., Hering B., Maluszynska J. (2007) *Multicolor FISH in an analysis of chromosome aberrations induced by N-nitroso-N-methylurea and maleic hydrazide in barley cells*. J. Appl. Genet. 48, 99-106.
- [11] Kim J.S., Klein P.E., Klein R.R. et al. (2005) *Chromosome identification and nomenclature of Sorghum bicolor*. Genetics 169, 1169-1173.
- [12] Kulikova O., Gualtieri G., Geurts R. et al. (2001) *Integration of the pachytene and genetic maps of Medicago truncatula*. Plant J. 27, 49-58.
- [13] Langer S., Kraus J., Jentsch I., Speicher R. (2004) *Multicolor chromosome painting in diagnostic and research applications*. Chromosome Research 12, 15-23.
- [14] Langer-Safer P.R., Levine M., Ward, D.G. (1982) *Immunological method for mapping genes on Drosophila polytene chromosomes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79, 4381-4385.
- [15] Lim K.Y., Matyasek R., Lichtenstein C.P., Leitch A.R. (2000) *Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the Nicotiana section Tomentosae*. Chromosoma 109, 245-258.
- [16] Lysak M.A., Berr A., Pecinka A. et al. (2006) *Mechanisms of chromosome number reduction in Arabidopsis thaliana and related Brassicaceae species*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103, 5224-5229
- [17] Lysak M.A., Franz P.F., Ali H.B.M., Schubert, I. (2001) *Chromosome painting in Arabidopsis thaliana*. Plant J. 28, 689-697.
- [18] Lysak M.A., Koch M.A., Pecinka A., Schubert I. (2005) *Chromosome triplication found across the tribe Brassicaceae*. Genome Res. 15, 516-525.
- [19] Maluszynska J. (2002) *In situ hybridization in plants – methods and application. Molecular techniques in crop improvement*. Jain M.S., Brar D.S., Ahloowalia B.S. (ed.) Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 299-326.
- [20] Maluszynska J., Hasterok R. Weiss H. (1998) *rRNA genes – their distribution and activity in plants*. [w:] *Plant Cytogenetics*. Maluszynska J. (ed.) Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego, Katowice, 75-95.
- [21] Maluszynska J., Juchimiuk J., Wolny E. (2003) *Chromosomal aberrations in Crepis capillaris cells detected by FISH*. Folia Histochemica et Cytobiologica 41, 101-104.
- [22] Maluszynska, J., Schweizer, D. (1989) *Ribosomal RNA genes in B chromosomes of Crepis capillaris detected by non-radioactive in situ hybridization*. Heredity, 62, 59-65.
- [23] Maluszynska, J., Szweykowska-Kulińska, Z. (2007) *Budowa genomu komórki*. [w:] *Biologia Komórki Roślinnej*, Wojtaszek P., Woźny A., Ratajczak L. (red), PWN, Warszawa.
- [24] Mittelsten Scheid O., Jakovleva L., Afsar K. et al. (1996) *A change of ploidy can modify epigenetic silencing*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 7114-7119.
- [25] Moscone E.A., Matzke M.A., Matzke A.J.M. (1996) *The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tobacco*. Chromosoma 105, 231-236.
- [26] Pedersen C., Langridge P. (1997) *Identification of the entire chromosome complement of bread wheat by two-colour FISH*. Genome 40, 589-593.
- [27] Rogalska S., Maluszynska J., Olszewska M.J. (2005) *Podstawy Cytogenetyki Roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
- [28] Strutski S., Doco-Fenzy M., Cornillet-Lefebvre P. (2002) *Compilation of published genomic hybridization studies*. Cancer Genet. Cytogenet. 135, 63-90.



- [29] Świtoński M., Słota E., Jaszczak K., (2006) *Diagnostyka cytogenetyczna zwierząt domowych*. Wydawnictwo Akademii Rolniczej, Poznań.
- [30] Tjio H.J., Levan A. (1956) *The chromosome numbers of man*. Hereditas 42, 1-5
- [31] Trask B.J. (2002) *Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting*. Nature Reviews/Genetics 3, 769-774.
- [32] Waldeyer W. 1888. *Über Karyokinese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen*. Arch. Mikr. Anat. 32, 1-222.
- [33] Weise A., Heller A., Starke H. et al. (2003) *Multitude multicolor chromosome banding (mMCB) – a cooperative one-step multicolor FISH banding method*. Cytogenetic and Genome Research 103, 34-39.
- [34] Ziolkowski P.A., Kaczmarek M., Babula D., Sadowski J. (2006) *Genome evolution in Arabidopsis/Brassica: conservation and divergence of ancient rearranged segments and their breakpoints*. Plants J. 47, 63-74.

#### Look at gene, chromosome and genome – molecular cytogenetic investigations

Cytogenetics is complementary to genetic and molecular analysis of genome structure and function. From the beginning it has been mainly used for identification of chromosomes and karyotype construction. Most significant for the progress in cytogenetics was development of chromosome banding techniques and *in situ* hybridization, especially fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and its different modifications which have become the most important techniques in molecular cytogenetics. FISH allows physical gene mapping and localization of different non-coding DNA sequences on chromosomes and interphase nuclei. Repetitive DNA sequences can generate unique FISH-signal patterns on individual chromosomes valuable for karyotyping and phylogenetic analysis. These studies have important implications for basic research and practical applications. The understanding of the structure, function, organization and evolution of genomes enabled many new cytogenetic applications to both medicine and agriculture, particularly in diagnosis and plant breeding.

**Key words:** chromosome, cytogenetics, DNA, FISH, genome research, chromosome aberrations, evolution, molecular biology

