

Kultura i fuzja protoplastów ziemniaka

TOMASZ KOMONÍ*[‡]

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
Oddział Naukowy w Młochowie
ul. Platanowa 19
05-831 Młochów

*autor, do którego należy kierować korespondencję:

tel.: +4822 729 90 27, faks +4822 729 92 47, e-mail: tomek.komon@wp.pl

Streszczenie

Protoplasty roślinne są szeroko wykorzystywane w badaniach funkcjonowania i organizacji komórek oraz genomów, transgenezy czy biosyntezy ważnych związków organicznych. W specjalnie stworzonych i kontrolowanych warunkach protoplasty wykazują zdolność do łączenia się (fuzji, inaczej hybrydyzacji), prowadzącej do powstania mieszańców somatycznych. W otrzymanych fuzantach występują nowe kombinacje genów jądrowych, cytoplazmatycznych czy jądrowo-cytoplazmatycznych ważnych pod względem poznawczym i aplikacyjnym. Ziemniak jest jedną z roślin uprawnych, w których hybrydyzacja somatyczna jest stosunkowo szeroko stosowana w pracach badawczych i hodowlanych. W niniejszej pracy przedstawiono najważniejsze zagadnienia związane z metodami otrzymywania protoplastów i mieszańców somatycznych ziemniaka oraz wybrane aspekty ich zastosowania we współczesnej hodowli.

Słowa kluczowe: protoplasty, fuzja protoplastów, mieszańce somatyczne, ziemniak

WSTĘP

Protoplasty roślinne są to pozbawione ściany komórkowej żywe komórki wraz z całą zawartością otoczone plazmolemą. Początki zastosowania protoplastów w badaniach biologicznych datują się na lata 70. ubiegłego wieku, kiedy to skutecznie udało się je wyizolować w wielu gatunkach roślin i utrzymywać w kulturach *in vitro* [1].

Każdy protoplast jest potencjalnie zdolny do odtworzenia nowej ściany komórkowej oraz rozpoczęcia podziałów mitotycznych, a w efekcie końcowym do re-

generacji w funkcjonalną i płodną roślinę. Dzięki tym właściwościom protoplasty stały się ważnym narzędziem badań struktury i funkcjonowania komórki oraz genomu roślin. Obecnie protoplasty wykorzystuje się rutynowo w laboratoriach na całym świecie w pracach z zakresu genomiki, proteomiki, metabolomiki, a także w nowoczesnej hodowli roślin uprawnych [2].

Ziemniak (*Solanum tuberosum* L.) pochodzi z Ameryki Południowej. Stamtąd upowszechnił się na całej kuli ziemskiej i obecnie uprawiany jest w ponad 125 krajach na świecie. Ziemniak jest zdrowym pokarmem zawierającym skrobię, pełnowartościowe białka, witaminę C, witaminy z grupy B oraz wiele niezbędnych składników mineralnych. Ocenia się, że ziemniak stanowi podstawę diety ponad miliarda ludzi na całym świecie, a odsetek jego konsumentów wciąż rośnie, szczególnie w Azji (Chiny, Indie) oraz Afryce. Skrobia znajduje zastosowanie w produkcji dekstryn, hydrolizatów, syropów, glukozy oraz krochmalu modyfikowanego. Wraz z etanolem są obecnie dwoma najważniejszymi produktami przetwarzania ziemniaka stosowanymi w przemyśle spożywczym, papierniczym, włókienniczym, farmaceutycznym, kosmetycznym i chemicznym. Etanol jest również wykorzystywany jako dodatek do paliw [3].

Znaczenie gospodarcze ziemniaka ma wpływ na zainteresowanie nim przedstawicieli różnych dyscyplin naukowych, w tym szczególnie szeroko rozumianej biotechnologii. Zastosowanie technik molekularnych pozwoliło lepiej zrozumieć i poznać strukturę i funkcjonowanie komórki oraz genomu ziemniaka. Biotechnologia umożliwiła również postęp we wprowadzaniu interesujących genów z różnych gatunków w ogólną pulę genową *S. tuberosum*. Ziemniak był jedną z pierwszych roślin uprawnych, w której z powodzeniem wprowadzono do badań protoplasty. Protoplasty i ich hybrydyzacja pozwoliły na wykorzystanie w hodowli *S. tuberosum* zasobów genowych dzikich gatunków z rodzaju *Solanum*, spokrewnionych z ziemniakiem uprawnym, ale się z nim nie krzyżujących, z pominięciem naturalnych barier krzyżowalności [4].

IZOLACJA PROTOPLASTÓW

Na początkowym etapie rozwoju kultur *in vitro* stosowano mechaniczną izolację protoplastów, polegającą na plazmolizie tkanki, a następnie na rozdrabnianiu jej skalpelem lub igłą preparacyjną pod mikroskopem. Obecnie technika ta praktycznie nie jest stosowana, ponieważ jest mało wydajna i powoduje liczne uszkodzenia komórek [5]. Mechaniczna izolacja protoplastów zastąpiona została metodą enzymatyczną, którą opracował Cocking [6], i która z małymi modyfikacjami, zależnymi od badanego gatunku rośliny, stosowana jest do dziś. Polega ona na wytrawieniu odpowiednimi enzymami ściany komórkowej bez naruszenia plazmolemy oraz cytoplazmy i jej zawartości. Cały proces enzymatycznej izolacji protoplastów odbywa się w kolejno następujących po sobie etapach: (i) przygotowania roślin rodzicielskich, (ii) przygotowania tkanki roślinnej, (iii) trawienia en-

zymatycznego, (iv) właściwej izolacji oraz (v) określenia żywotności otrzymanych protoplastów.

Materiał wyjściowy do izolacji protoplastów stanowią aseptyczne rośliny wprowadzone z kultur *in vitro* [7]. Protoplasty można również izolować z roślin rosnących w szklarni lub w polu. Jednak nie jest to wskazane, ponieważ zmienne czynniki zewnętrzne oraz sterylizacja roślin silnie obniżają jakość otrzymywanych z nich protoplastów [8]. Protoplasty ziemniaka są najczęściej izolowane z mezofilu liści, rzadziej natomiast z hypokotyli, liścieni, siewek, zielonych części pędów, korzeni lub z zawiesiny komórkowej [9,10].

Przygotowanie tkanki roślinnej do izolacji protoplastów polega na stabilizacji komórek w procesach plazmolizy oraz na eliminacji skrobi syntetyzowanej w warunkach świetlnych. W tym celu stosowane są następujące metody: (i) dwudniowa inkubacja liści w roztworach flotujących i kondycjonujących w warunkach ciemności [11], (ii) pozostawienie całych roślin w ciemności na 1–2 doby, a następnie dwu- lub trzygodzinna inkubacja tkanki w roztworze plazmolizującym [12], (iii) sześciogodzinna inkubacja liści w roztworze prekondycjonującym [13] oraz (iv) trzytygodniowa hodowla roślin *in vitro* w warunkach obniżonego natężenia światła, obniżonej temperatury i skróconego fotoperiodu [14]. Splazmolizowaną i pozbawioną skrobi tkankę rozdrabnia się, aby ułatwić dostęp enzymów do komórek. Najczęściej stosowaną techniką rozdrabniania tkanki jest krojenie liści na paski szerokości 1-2 mm [15, 16]. Rzadziej, w celu odświeżenia mezofilu, usuwa się dolną epidermę za pomocą pincety lub pocierania szczoteczką [17]. Następnie tak przygotowaną tkankę roślinną poddaje się trawieniu enzymatycznemu.

Trawienie enzymatyczne tkanki roślinnej przebiega w roztworach zawierających enzymy pektynolityczne, tzw. pektynazy (np. Macerosyme, Pectolyase, Macerace), które uwalniają komórki z tkanki oraz enzymy celulolityczne – celulazy, hydrolizujące ścianę komórkową (np. Cellulase Onozuka, Driselase, Cellulysin) [18, 19]. Protoplasty ziemniaka izolowano, stosując stężenia enzymów na poziomie 0,05–3%. Stężenie enzymów ustalane jest doświadczalnie i jest wypadkową gatunku rośliny, użytej tkanki, czasu inkubacji (najczęściej do 18 godzin) oraz temperatury inkubacji (22–27°) [11, 20]. Do roztworu enzymów dodawane są sole mineralne i regulatory ciśnienia osmotycznego, np. sacharoza, glukoza, mannitol lub sorbitol. Wymienione regulatory ciśnienia osmotycznego utrzymują potencjał osmotyczny na poziomie 600–800 mOsm, zapewniając odpowiedni stopień plazmolizy komórek oraz zmniejszając stopień uszkodzeń protoplastów [21]. Wśród soli mineralnych dodawanych do roztworu trawiącego najważniejsze są jony wapnia, które zwiększają stabilność błon komórkowych i podnoszą przeżywalność protoplastów [22]. Stwierdzono, że dodawanie soli amonowych jest niekorzystne, gdyż obniżają one wydajność izolacji protoplastów [23]. W niektórych przypadkach do roztworu enzymatycznego dodaje się albuminę wołową [24]. BSA chroni plazmolemę przed proteazami, jakie mogą występować w gorszej jakości preparatach celulaz i pektynaz. Proteazy, niszcząc białka błonowe, zmniejszają stopień przeżywalności protoplastów. Rola ochronna albuminy polega na współ-

zawodniczeniu z białkami błonowymi o centra aktywne enzymów proteolitycznych. W celu podwyższenia przeżywalności izolowanych protoplastów można także stosować przeciwutleniacz – ditiotreitól, który zmniejsza skutki stresu oksydacyjnego prowadzącego do apoptozy komórek [25]. Oprócz składu mieszaniny trawiącej, niezwykle ważna jest odpowiednia proporcja masy tkanki do objętości roztworu. Zazwyczaj na 1 g świeżej masy stosuje się 10 cm³ mieszaniny trawiącej. Trawienie prowadzi się w ciemności na szalce Petriego, ze wskazanym łagodnym kołysaniem [26, 27]. Poprawnie przeprowadzone trawienie enzymatyczne pozwala wg różnych autorów uzyskać od 100 tys. do kilku milionów protoplastów z 1 g tkanki [2].

Bezpośrednio po zakończeniu trawienia enzymatycznego następuje izolacja właściwa protoplastów, podczas której żywotne protoplasty oddzielane są od pozostałości niedotrawionej tkanki i uszkodzonych komórek. Pierwszym etapem izolacji właściwej jest sączenie mieszaniny trawiącej przez specjalne sitka o odpowiedniej średnicy oczek (50–200 μm) [28]. Następnie przeprowadza się wirowanie przesącza w roztworze o dużej gęstości (0,3–0,4 M sacharoza, rzadziej mannitol, sorbitol lub Percoll), po którym żywotne i nieuszkodzone komórki unoszą się na powierzchni supernatantu w postaci pierścienia. Uszkodzone, martwe lub posiadające ścianę komórkową protoplasty tworzą osad na dnie próbówki lub pozostają w roztworze [1]. Wyizolowane oraz oczyszczone protoplasty umieszcza się w świeżej pożywce do kultury protoplastów.

Wyizolowane protoplasty oceniane są w komorze Thoma pod kątem liczby żywych komórek otrzymanych z danej jednostki masy. Żywotność komórek oceniana jest za pomocą barwienia przyżyciowego przy zastosowaniu błękitu Ewansa lub FDA. Błękit Ewansa (roztwór 1% przez 5 min) wybarwia martwe protoplasty z uszkodzonymi błonami, które nie mogą uczestniczyć w aktywnym usuwaniu barwnika z cytoplazmy [29]. Dwuocjan fluoresceiny (roztwór 0,05% przez 5 min) wybarwia protoplasty żywe. Działanie FDA opiera się na aktywności esteraz, które w żywych komórkach odcinają grupy octanowe tego związku, uwalniając fluoresceinę, która świeci żółtozielono w widmie niebieskim mikroskopu fluorescencyjnego [12].

KULTURA PROTOPLASTÓW

Wyizolowane żywotne protoplasty przenoszone są na pożywkę. Na pożywce następuje odbudowanie ściany komórkowej, podziały mitotyczne, tworzą się kolonie komórek, a następnie mikrokalusów (protoklonów), zachodzi ich morfogeneza i ostatecznie regeneracja funkcjonalnych roślin. Proces kultury protoplastów podlega działaniu wielu czynników, które mają wpływ na efekt końcowy. Do tych najważniejszych czynników należą: zagęszczenie protoplastów w pożywce, odpowiedni skład pożywki, temperatura, natężenie światła oraz fotoperiod [30].

Zagęszczenie protoplastów w pożywce jest jednym z ważniejszych czynników wpływających stymulująco na regenerujące komórki. Najlepsze rezultaty regeneracji protoklonów uzyskuje się przy ilości 10^4 – 5×10^6 protoplastów/cm³ pożywki [31, 32]. Liczne są doniesienia o stymulującym wpływie bliskiego sąsiedztwa dzielących się, aktywnych mitotycznie komórek na regenerujące protoplasty. Jest to tzw. kultura „niańki”. Polega ona na umieszczeniu w jednej pożywce protoplastów i szybko rosnącej kultury tkankowej (najczęściej kalusa), oddzielonych od siebie błoną półprzepuszczalną. Membrana umożliwia przenikanie składników pożywki (zwłaszcza aminokwasów i witamin) z kultury tkankowej do zawiesiny protoplastów, przy jednoczesnym fizycznym rozdzieleniu od siebie wymienionych systemów komórkowych. Odmianą kultury „niańki”, ale bez stosowania błony półprzepuszczalnej jest tzw. pożywka przystosowawcza, którą wcześniej kondycjonowano w krótkiej hodowli intensywnie rosnącego kalusa [2].

W hodowli protoplastów ziemniaka najczęściej stosowane są pożywki stałe w postaci cienkiej warstwy specjalnej, niskotopliwej agarozy (SeaPlaque Agarose). Protoplasty zatapiane są w całej objętości pożywki stałej na szalkach Petriego. Daje to duże możliwości swobodnego manipulowania zatopionymi protoplastami, pasażowania ich na świeże pożywki, w których prowadzone są następne etapy kultury [33-35]. Uważa się, że zestalenie pożywki jest czynnikiem wpływającym korzystnie na rozwój kultury i zwiększającym udział zregenerowanych protoplastów [36]. Znacznie rzadziej stosowane są media płynne, w których wyizolowane protoplasty zawieszają się w kropli „siedzącej” na dnie szalki lub kropli „wiszącej” na wieczku [14]. W pożywce stałej łączonej z płynną protoplasty umieszcza się w medium agarozowym, które następnie w postaci kropli umieszcza się na dnie płytki Petriego i po zestaleniu zalewa pożywką płynną [37]. Kultura *in vitro* protoplastów ziemniaka, ze względu na ich duże wymagania pokarmowe (zwłaszcza przed regeneracją ściany komórkowej) oparta jest na bogatych pożywkach MS [38], Cul [39], KM [40], B5 [41] oraz SKM [42] (tab. 1). Do pożywek dodawane są najczęściej regulatory wzrostu są: BAP, NAA, kinetyna, GA3, zeatyna, IAA, kwas abscysynowy. Źródłem węgla dla regenerujących protoplastów są sacharoza lub glukoza [30].

Tabela 1.

Skład pożywek do kultur protoplastów

składniki [mg/l]	SKM	Cul	KM	B5	MS
H ₃ BO ₃	3	3,1	3,0	3,0	6,2
KCl	300	-	300	-	-
KI	0,75	0,41	0,75	0,75	0,83
KH ₂ PO ₄	680	170	170	-	170
KNO ₃	1900	1900	1900	2500	1900
NH ₄ NO ₃	-	-	600	-	1650
CaCl ₂ x 2H ₂ O	600	600	440	220	440

CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,0025	0,013	0,025	0,025	0,025
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,0025	0,013	0,025	0,025	0,025
MgSO ₄ x 7H ₂ O	350	180	146,55	370	370
MnSO ₄ x H ₂ O	10	8,45	10	10,0	16,9
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	2	4,3	0,02	2,0	8,6
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25	0,13	0,26	0,25	0,26
EDTA NaFe x 2H ₂ O	47,3	23,6	47,3	37,0	47,3
NH ₄ Cl	-	107	-	-	-
siarczan adeniny	-	40	-	-	40
tiamina HCl	2	0,5	1,0	10,0	10
pirydoksyna HCl	0,5	5	0,2	1,0	1
kwas nikotynowy	5	5	1,0	1,0	1
biotyna	0,005	0,05	1,0	-	-
glicyna	-	2	-	-	-
kwas foliowy	0,2	0,5	100	-	-
D-Ca-pantotenan	0,5	-	1,0	-	-
kwas p-aminobenzoesowy	0,01	-	2,0	-	-
chlorek choliny	0,5	-	0,4	-	-
ryboflawina	0,1	-	1,0	-	-
kwas askorbinowy	1	-	0,01	-	-
L-glutamina	-	-	-	-	-
hydrolizat kazeiny	250	100	-	-	-
BAP	0,4	-	-	-	-
NAA	1	0,1	-	-	-
kinetyna	-	-	-	-	-
t-zeatyna	-	1	-	-	-
GA ₃	-	-	-	-	-
celobioza	250	-	-	-	-
D-mannitol	40000	54700	-	-	-
glukoza	10000	-	-	-	-
fruktoza	250	-	-	-	-
inozytol	50	100	-	100	100
mannoza	250	-	-	-	-
sacharoza	10000	2500	-	20000	20000
sorbitol	250	-	-	-	-
ramnoza	250	-	-	-	-
ryboza	250	-	-	-	-
ksyloza	25	-	-	-	-
BSA	1	-	-	-	-
woda kokosowa [ml/l]	22	-	-	-	-
agar	6000	8000	8000	8000	6000

Warunki cieplne, oświetleniowe oraz fotoperiod ustalane są eksperymentalnie odpowiednio do genotypu, odmiany czy gatunku *Solanum*. Na ogół stosuje się temperaturę około 22–26°C (dzień) i 19–22°C (noc), przy fotoperiodzie 14–16 h/10–8 h dzień/noc i intensywności oświetlenia 1000–4000 luksów [43–45].

Wydajność kultury protoplastów określana jest na podstawie oceny wysiewu wyrażającej się stosunkiem liczby komórek ulegających efektywnym działom do całkowitej liczby protoplastów znajdujących się w danej pożywce. Właściwie prowadzona kultura protoplastów powinna charakteryzować się wydajnością wysiewu od 20 do 80%. Niższy odsetek regenerujących protoplastów informuje o konieczności optymalizacji warunków prowadzenia hodowli. Całkowity czas zregenerowania protoplastów do w pełni funkcjonalnej rośliny poprzez etap tworzenia się mikrokalusów i organogenezę trwa około 2 miesięcy [46].

FUZJA PROTOPLASTÓW

Fuzja somatyczna (hybrydyzacja somatyczna) jest fizycznym procesem spontanicznego łączenia się wyizolowanych komórek. Zjawisko łączenia się ze sobą protoplastów pomimo jego naturalnej spontaniczności jest niezwykle trudne. Przyczyną tych trudności jest ujemny ładunek elektryczny grup fosforanowych błony komórkowej powodujący odpychanie elektrostatyczne protoplastów. Wzajemny kontakt pomiędzy komórkami uniemożliwia także hydrofobowość plazmolemy spowodowana dominującym udziałem kwasów tłuszczowych w jej strukturze [47]. Bariery te pokonano poprzez zastosowanie tzw. fuzogenów, czyli czynników stymulujących fuzję. Fuzogen umożliwia bezpośredni kontakt błon protoplastów, podczas którego następuje ich niszczenie, a następnie odbudowa. W konsekwencji dochodzi do łączenia się cytoplazm komórek wraz z ich zawartością. Ze względu na rodzaj użytego fuzogenu wyróżnia się następujące metody hybrydyzacji somatycznej: (i) chemiczną, (ii) elektrofuzję, (iii) ultradźwiękową oraz (iv) z wykorzystaniem mikromanipulatora [2]. Najszerze zastosowanie w badaniach naukowych znalazły dwie pierwsze metody, pozostałe natomiast wykorzystywane są marginalnie.

Fuzogenem chemicznym stosowanym na szeroką skalę jest glikol polietylenowy (PEG – polyethylene glycol) o masie cząsteczkowej 6000 Da i stężeniu 25–40% w obecności jonów wapnia. Fuzja chemiczna może się odbywać w skali mikro i makro. W metodzie mikro protoplasty komponentów rodzicielskich łączy się ze sobą i inkubuje w roztworze stymulującym w zagłębieniach płytek titracyjnych lub na szalkach Petriego. W zagłębieniach płytek lub na szalkach dochodzi do fuzji komórek, które potem swobodnie opadają na ich dno. Następnie fuzogen wypłukuje się pożywką do kultury fuzantów [48, 49]. W skali makro hybrydyzacja odbywa się w próbówce, a swobodne opadanie komórek, a także płukanie zastąpione jest łagodnym wirowaniem [50, 51].

W elektrofuzji do zapoczątkowania łączenia się protoplastów wykorzystywane są impulsy elektryczne działające na mieszaninę protoplastów umieszczoną pomiędzy elektrodami. Hybrydyzacja elektryczna składa się z dwóch etapów. W etapie pierwszym mieszanina protoplastów komponentów rodzicielskich poddawana jest działaniu prądu zmiennego o wysokiej częstotliwości (0,5–4 MHz) i niskim natężeniu (100–200 V/cm). Prąd zmienny prowadzi do tworzenia się sznura łączących się ze sobą protoplastów wzdłuż linii sił pola elektrycznego. W etapie drugim zostaje przyłożony prąd stały (1000–2000 V/cm) o krótkim impulsie (2–30 μ s), jednorazowo lub w postaci szybko następujących po sobie serii impulsów. Efektem działania prądu stałego jest powstawanie w plazmolemie licznych odwracalnych perforacji (mikroporów), umożliwiających łączenie się cytoplazmy sąsiadujących protoplastów [21, 52, 53].

Wynikiem fuzji protoplastów komórek somatycznych jest otrzymanie mieszańców somatycznych. Wyróżniamy kilka typów mieszańców somatycznych. Mieszaniec posiadający kompletne genomy jądrowe obydwu komponentów rodzicielskich jest mieszańcem symetrycznym [44, 48, 52]. Eliminacja podczas fuzji chromosomu (-ów) lub jego fragmentów, albo nawet części jednego z genomów, prowadzi do powstania fuzanta asymetrycznego [53]. Innym typem mieszańca asymetrycznego jest tzw. cybryda lub inaczej mieszaniec cytoplazmatyczny. Cybryda posiada jądro komórkowe jednego rodzica, plastydy oraz mitochondria obydwu komponentów fuzji albo cytoplazmę komponenta innego niż dawca jądra. Mieszaniec cytoplazmatyczny powstaje w wyniku fuzji cytoplastu z karioplastem [2]. Cytoplasty są to protoplasty pozbawione jądra komórkowego w wyniku procesu enukleacji. Jądra komórkowe można niszczyć poprzez traktowanie protoplastów cytochalazyną B i wirowanie w gradiencie [55]. W celu enukleacji często stosuje się także promieniowanie UV, rzadziej γ lub X [56, 57]. Karioplast jest strukturą składającą się z jądra komórkowego otoczonego bardzo cienką warstwą cytoplazmy oraz błoną komórkową. Genom plastydowy i mitochondrialny w karioplastach degradowano poprzez traktowanie komórek jodoocetanem lub rodaminą 6G [58]. Produktem procesów enukleacji lub niszczenia plastydów i mitochondriów są również tzw. mikroprotoplasty (fragmenty protoplastów wraz z kilkoma chromosomami otoczonymi fragmentem cytoplazmy) oraz mikroplasty (fragmenty cytoplazmy otoczone plazmolemą bez struktur jądra komórkowego [1]).

WERYFIKACJA MIESZAŃCÓW SOMATYCZNYCH

Mieszanina pofuzyjna zawiera heterokariony (heterokariocyty), czyli produkty obydwu komponentów fuzji, homokariony (homokariocyty) – produkty komponentów rodzicielskich, które uległy tzw. autofuzji oraz protoplasty nie biorące udziału w hybrydyzacji somatycznej, a także komórki zdegenerowane [2]. Wyróżnienie heterokarionów z tak zróżnicowanej mieszaniny produktów hybrydyzacji somatycznej odbywa się za pomocą specjalnych technik. Niezmiernie rzad-

ko heterokariocyty można odróżnić na podstawie morfologii fuzantów. Jest to możliwe, jeżeli różnice pomiędzy komórkami rodzicielskimi, np. w wielkości czy barwie organelli, są wyraźne [2]. Innym sposobem wstępnej selekcji heterokariocytów jest przyżyciowe barwienie komponentów protoplastów rodzicielskich. Najczęściej stosowanymi barwnikami są FDA (powoduje żółtozielone świecenie w UV) oraz izotiocyjanian rodminy B (powoduje czerwona fluorescencję). W heterokariocycie w świetle UV mikroskopu fluoroscencyjnego widoczne jest świecenie obydwu barwników [12]. Innym przykładem odróżniania heterokarionów od pozostałych produktów fuzji jest stosowanie specjalnych pożywek selekcyjnych. W metodzie tej wykorzystuje się zróżnicowaną tolerancję roślin na antybiotyki. Gdy każdy rodzic wykazuje tolerancję na inny rodzaj antybiotyku, to fuzanty są tolerancyjne w stosunku obu preparatów biobójczych jednocześnie. Prawidłowy rozwój fuzanta na podłożu z dodatkiem dwóch antybiotyków wskazuje, że powstał z protoplastów obu rodziców. Do selekcji najczęściej stosuje się obecne na rynku antybiotyki: kanamycynę i streptomycynę [47]. W niektórych przypadkach możliwe jest odróżnienie mieszańców na etapie formowania się kalusów, na podstawie obserwowanych różnic w ich morfologii i wigorze [56]. Niektórzy badacze zastosowali do selekcji funkcjonalnych heterokarionów cytometrię przepływową w połączeniu z automatycznym selekcionowaniem komórek [34].

Metodami tymi dokonuje się wstępnej selekcji heterokarionów mieszańcowych. Ostatecznym potwierdzeniem mieszańcowości otrzymanych fuzantów jest analiza zregenerowanych roślin w porównaniu z formami matecznymi. Do oceny i identyfikacji wyprowadzonych fuzantów wykorzystuje się markery morfologiczne, cytogenetyczne, biochemiczne oraz genetyczne.

Analiza morfologiczna mieszańców somatycznych opiera się na porównaniu do form rodzicielskich i opisie np. wyglądu liści, kwiatów, słupków i pręcików, pyłku oraz nasion. Metoda ta stosowana jest od początków doświadczeń nad fuzją somatyczną do dziś, ze względu na jej niski koszt oraz prostotę wykonania [46, 58, 59]. Obecnie ocena fenotypowa jest uzupełnieniem innych technik weryfikowania mieszańcowości fuzantów.

Badania cytogenetyczne nie dają jednak odpowiedzi na pytanie, czy zregenerowana roślina jest mieszańcem somatycznym. Służą głównie do oszacowania ploidalności fuzanta [2]. Do najprostszych metod cytogenetycznych umożliwiających szybkie oszacowanie poziomu ploidalności należy liczenie chloroplastów w komórkach przyszparkowych aparatów szparkowych dolnej epidermy liści [7, 46]. Ploidalność określa się także za pomocą liczenia chromosomów w komórkach metafazowych wierzchołków wzrostu korzenia. Utrudnieniem w tej metodzie są małe rozmiary chromosomów ziemniaka [12,33]. W badaniach cytogenetycznych fuzantów ziemniaka dosyć często stosowana jest cytometria przepływowa [44, 60]. Metoda ta pozwala szybko i skutecznie określić liczbę, strukturę chromosomów i poziom ploidalności oraz rozpoznać procesy rekombinacji, segregacji i eliminacji części chromosomów, które mogą zachodzić podczas hybrydyzacji somatycznej. Z innych technik coraz częściej stosowana jest genomowa hybry-

dyzacja *in situ* (GISH), która pozwala uwidocznic odpowiednie fragmenty genomu obojga rodziców użytych do fuzji [61].

Markery izoenzymatyczne służą do analizy biochemicznej mieszańców somatycznych. Wykorzystanie tych markerów polega na porównaniu roślin otrzymanych w wyniku fuzji protoplastów z roślinami rodzicielskimi pod względem składu i występowania izoform enzymów. Thieme i in. [24] do oceny mieszańcowości produktów hybrydyzacji protoplastów *S. tuberosum* z *S. pinnatisectum* zastosowali peroksydazę. W badaniach innego mieszańca, *S. tuberosum* (+) *S. bulbocastanum* użyto 8 enzymów (izomerazy fosfoglukozy, dehydrogenazy 6-fosfoglukanianowej, dehydrogenazy jabłczanowej, kwaśnej fosfatazy, transaminazy glutaminianowej, fosfoglukomutazy, peroksydazy, dehydrogenazy alkoholowej) [62].

W badaniach mieszańców somatycznych ziemniaka również znalazły zastosowanie markery molekularne. Markery RAPD wykorzystano do weryfikacji mieszańcowości fuzantów otrzymanych pomiędzy *S. tuberosum* i *S. bulbocastanum* [63] oraz fuzantów *S. tuberosum* (+) *S. pinnatisectum* [33]. Oberwald i in. [56] wykorzystał polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) do oceny mieszańcowości form uzyskanych pomiędzy *S. tuberosum* z dwoma dzikimi gatunkami ziemniaka: *S. bulbocastanum* i *S. circaefolium* ssp. *quimense*. Markery RAPD i RFLP jednocześnie zastosowano do określenia mieszańcowości fuzantów powstałych z hybrydyzacji *S. melongena* (+) *S. sisymbriifolium* [64] oraz form otrzymanych z fuzji protoplastów *S. tuberosum* i *S. bulbocastanum* [48]. W badaniach mieszańców somatycznych *S. tuberosum* (+) *S. berthaultii* Bładani i in. [65] użyli markerów opartych na polimorfizmie odcinków DNA pomiędzy sekwencjami mikrosatelitarnymi (ISSR, inter simple sequence repeats). Niektórzy autorzy podjęli próbę analizy mieszańców somatycznych za pomocą badań genomów mitochondrialnych oraz plastydowych. Scotti i in. [66] potwierdził otrzymanie fuzantów *S. tuberosum* (+) *S. commersoni* na podstawie analizy restrykcyjnej mitochondrialnych genów z regionu *rpl5-rpl14*, zaś Bastia i in. [45] badał sekwencje DNA chloroplastowego tej samej kombinacji rodzicielskiej.

Silnie i często zachodzące procesy eliminacji części materiału genetycznego komórek mieszańcowych podczas i po fuzji mogą powodować, że dany marker może nie wykazywać takiego sprzężenia z daną cechą, które występowało u jednego z rodziców. Dlatego też na ogół do identyfikacji mieszańców somatycznych stosuje się jednocześnie różne markery [24, 32, 44, 67].

WYBRANE ASPEKTY ZASTOSOWANIA MIESZAŃCÓW SOMATYCZNYCH W HODOWLI ZIEMNIAKA

Pierwsze udane próby izolacji protoplastów z mezofilu liści ziemniaka i regeneracji z nich roślin wykonali Butenko i in. [68] oraz Shepard i Toten [69]. Fuzję protoplastów w obrębie *S. tuberosum* przeprowadzili Melchers i in. [70], a hybrydyzację somatyczną dzikich gatunków *S. etuberosum* i *S. pinnatisectum* z uzyska-

niem w pełni wykształconych mieszańców przeprowadzili Hermsen i Taylor [71]. Jednym z pierwszych praktycznych zastosowań fuzji protoplastów w hodowli ziemniaka było przeniesienie odporności na herbicyd (atrazynę) z dzikiego gatunku *S. nigrum* do *S. tuberosum* przez Bindinga i in. [72].

Intensywne i ciągle prowadzone badania nad dzikimi gatunkami ziemniaka lub spokrewnionymi z nim gatunkami z rodzaju *Solanum* potwierdzają ich ogromny potencjał jako źródeł nowych alleli cech jakościowych i odpornościowych. Bezpośrednie wykorzystanie zmienności genetycznej dzikich lub odległych gatunków *Solanum* nie zawsze jest możliwe ze względu na szereg naturalnych barier krzyżowalności. Zastosowanie fuzji somatycznej pozwala na pominięcie niektórych barier i uzyskanie połączeń genomów interesujących nas form rodzicielskich [73].

Rośliny o potwierdzonej mieszańcowości uzyskane w wyniku fuzji protoplastów wnoszą nową zmienność genetyczną, inną jakościowo niż zmienność uzyskiwana za pomocą tradycyjnych metod. Hybrydyzacja somatyczna umożliwia wprowadzenie nowych, interesujących genów z dzikich gatunków *Solanum* na tło genetyczne *S. tuberosum*, ale gatunki dzikie są również donorami cech nieprzydatnych lub niepożądanych w hodowli. Ważne jest otrzymanie płodnych mieszańców somatycznych umożliwiających przeprowadzenie krzyżowań wstecznych mieszańca z formą *S. tuberosum*. Przenoszenie niepożądanych genów z gatunków dzikich uniemożliwia również częściowo zastosowanie fuzji asymetrycznej, w której nastąpiła eliminacja genomów jądrowych lub/i cytoplazmatycznych [30, 74].

Dzikie i uprawne gatunki ziemniaka były głównie wykorzystywane jako źródło odporności na różne patogeny, jak wirusy, bakterie lub grzyby. W wyniku fuzji somatycznej gatunków z rodzaju *Solanum* z *S. tuberosum* uzyskano mieszańce somatyczne wykazujące ekspresje wprowadzonych genów odporności (tab. 2). Aktualne trendy hodowli na ogół miały wpływ na wybór cech wprowadzanych do *S. tuberosum* za pomocą hybrydyzacji somatycznej. W mniejszym stopniu zajmowano się przekazywaniem cech jakościowych lub fizjologicznych [2].

W pracach nad mieszańcami somatycznymi ziemniaka komponentami rodzicielskimi były zarówno gatunki wytwarzające bulwy (np. *S. tuberosum*, *S. phureja*, *S. pinnatisectum*, *S. bulbocastanum*), jak i nie tuberyzujące (np. *S. nigrum*, *S. brevidens*) [75].

Jednym z pierwszych dzikich gatunków ziemniaka wykorzystanym na szeroką skalę jako komponent rodzicielski w hybrydyzacji somatycznej był *S. brevidens*. Fuzjonując protoplasty tego gatunku z protoplastami *S. tuberosum*, otrzymano mieszańce somatyczne odporne na *Pectobacterium carotovora* – powodującą mokrą zgniliznę bulw, *Phytophthora infestans* – odpowiedzialną za zarazę ziemniaka, wirusy X (PVX – *potato virus X*) i Y (PVY – *potato virus Y*) oraz liścierzwoju ziemniaka (PLRV – *potato leaf roll wirus*). Z sukcesem przekazano geny odporności na te patogeny z mieszańców somatycznych do ziemniaka uprawnego w wyniku wstecznych krzyżowań generatywnych [31, 60, 76-78].

Tabela 2.

Przykłady cech wprowadzonych z dzikich gatunków *Solanum* do *S. tuberosum* na drodze fuzji somatycznej

mieszaniec somatyczny	cecha uzyskana w wyniku fuzji	piśmiennictwo
<i>S. tuberosum</i> (+) <i>S. brevidens</i>	odporność na PLRV	[60,76]
	odporność na PVX, PVY i PLRV	[77]
	odporność na bakterie <i>Erwinia</i> spp.	[78]
	odporność na <i>P. infestans</i>	[31]
	odporność na <i>Erwinia</i> spp. i <i>P. infestans</i>	[79]
<i>S. tuberosum</i> (+) <i>S. etuberosum</i>	odporność na PVY	[61]
<i>S. tuberosum</i> (+) <i>S. bulbocastanum</i>	odporność na <i>P. infestans</i>	[48]
	odporność na nicienie <i>Meloidogyne chitwoodi</i>	[62]
<i>S. tuberosum</i> (+) <i>S. stenotomum</i>	odporność na bakterie <i>Ralstonia solanacearum</i>	[80]
<i>S. tuberosum</i> (+) <i>S. phureja</i>	odporność na bakterie <i>R. solanacearum</i>	[67]
<i>S. tuberosum</i> (+) <i>S. pinnatisectum</i>	odporność na <i>P. infestans</i>	[24]
	odporność na bakterie <i>Erwinia</i> spp.	[86]
<i>S. tuberosum</i> (+) <i>S. nigrum</i>	odporność na <i>P. infestans</i>	[59,81]
<i>S. tuberosum</i> (+) <i>S. commersoni</i>	odporność na bakterie <i>R. solanacearum</i>	[82]
	odporność na <i>Verticillium dahliae</i>	[45]
<i>S. tuberosum</i> (+) <i>S. verrucosum</i>	odporność na PLRV	[83]
<i>S. tuberosum</i> (+) <i>S. acule</i>	odporność na PVX	[84]
<i>S. tuberosum</i> (+) <i>S. circaeifolium</i>	odporność na <i>P. infestans</i>	[85]
<i>S. melongena</i> (+) <i>S. sisymbriifolium</i>	odporność na <i>R. solanacearum</i> oraz <i>V. dahliae</i>	[64]
<i>S. melongena</i> (+) <i>S. aethiopicum</i>	odporność na <i>Fusarium</i> spp.	[32]
<i>S. tuberosum</i> (+) <i>S. tarnii</i>	odporność na PVY i <i>P. infestans</i>	[86]

Przy wyborze partnerów do fuzji używa się na ogół form diploidalnych, chociaż Szczerbakowa i in. [81] z powodzeniem przeprowadzili hybrydyzację somatyczną protoplastów heksaploidalnego *S. nigrum* z diploidami *S. tuberosum*. *S. nigrum* jest gatunkiem odpornym na *P. infestans*, sprawcę zarazy ziemniaka. Uzyskano mieszańce, które zawiązywały struktury bulwopodobne, pomimo że *S. nigrum* jest gatunkiem nietuberyzującym. Niestety, niestabilność genetyczna oraz niepłodność pyłku były główną przyczyną niepowodzenia krzyżowań generatywnych otrzymanych mieszańców *S. nigrum* (+) *S. tuberosum* z formami ziemniaka uprawnego [59].

Badania nad fuzantami nie ograniczają się do testów w warunkach laboratoryjnych *in vitro* czy szklarniowych. Mieszańce somatyczne ziemniaka charakteryzowano także w rozmnożeniach polowych. Pierwsze doświadczenia polowe z fuzantami *S. tuberosum* (+) *S. brevidens* przeprowadzili Austin i in. [87]. Jakuczun i in. [88] stwierdzili, że mieszańce somatyczne dobrze znoszą warunki polowe. Rozmnażane rośliny były bujne, intensywnie kwitły, w większości tuberyzowały, a jakość bulw była bardzo zróżnicowana. Thieme i in. [86] uzyskali mieszańce

somatyczne *S. tuberosum* (+) *S. tarnii*. Mieszańce te charakteryzowały się wysoką odpornością na PVX oraz *P. infestans*. Poprzez krzyżowania wsteczne fuzantów z odmianą Delikt, autorzy otrzymali potomstwo (BC1), które charakteryzowało się odpornością na wirus X ziemniaka, jednakże odporność na zarazę ziemniaka była już niska. Wybrane mieszańce *S. tuberosum* (+) *S. tarnii* oraz ich potomstwo BC1 poddano również ocenom polowym, uzyskując bulwy o dobrej jakości i zadawalającym plonie. Doświadczenia polowe z mieszańcami somatycznymi pozwalają przypuszczać, że wykorzystanie ich w hodowli ziemniaka jest możliwe, chociaż wymaga dalszych prac metodycznych.

PODSUMOWANIE

Obserwowany w ciągu ostatnich 20 lat znaczny postęp metod pozyskiwania protoplastów ziemniaka, a następnie poddawania ich fuzji, może zostać w przyszłości z powodzeniem wykorzystany do hodowli nowych odmian. Mieszańce somatyczne pozwalają poszerzyć zawężoną pulę genową *S. tuberosum*. Hybrydyzacja somatyczna umożliwia pominięcie barier gatunkowych, których nie można było pokonać w tradycyjnych krzyżowaniach seksualnych. Mieszańce somatyczne są źródłem poznania mechanizmów dziedziczenia oraz poszerzają wiedzę na temat losu materiału genetycznego podczas procesów rekombinacji oraz rearanżacji genomów jądrowych i cytoplazmatycznych. Próby przeniesienia pożądaných cech do *S. tuberosum* za pomocą hybrydyzacji somatycznej nie zawsze kończą się sukcesem. Niejednokrotnie obserwuje się obniżenie ekspresji wprowadzanego genu w fuzantach w porównaniu z ekspresją tego genu w komponencie rodzicielskim. Pomimo wielu trudności w procesie otrzymywania mieszańców somatycznych ziemniaka prognozuje się dalszy rozwój prac nad hybrydyzacją protoplastów. Aczkolwiek rozwój ten związany być musi z dalszymi doświadczeniami w zakresie optymalizacji warunków izolacji, kultury i fuzji protoplastów oraz selekcji i regeneracji w pełni funkcjonalnych roślin mieszańcowych.

Wykaz stosowanych skrótów:

BAP – 6-benzyloaminopuryna (6-benzyloaminopurine)

BSA – albumina wołowa (bovine serum albumine)

FDA – dwuocian fluorosceiny (fluoresceine diacetate)

GA₃ – kwas giberelinowy (gibberellic acid)

IAA – kwas indolilo-3-octowy (indole-3-acetic acid)

ISSR – między-mikrostralitarny polimorfizm odcinków DNA (inter-simple sequence repeat)

NAA – kwas α -naftylooctowy (α -naphthaleneacetic acid)

RAPD – polimorfizm losowo powielonych fragmentów DNA (random amplified polymorphic DNA)

RFLP – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (restriction fragment length polymorphism)

PIŚMIENNICTWO

1. Davey MR, Anthony P, Power JB, Lowe KC. Protoplast applications in biotechnology. In: Goodman RM, ed. Encyclopaedia of plant and crop science. New York 2004:1061-64.
2. Davey MR, Anthony P, Power JB, Lowe KC. Plant protolast: status and biotechnological perspectives. *Biotech Adv* 2005; 23:131-71.
3. Mullins E, Milbourne D, Petti C, Doyle-Prestwich BM, Meade C. Potato in the age of biotechnology. *Trends Plant Sci* 2006; 11:254-60.
4. Rommens CM, Haring MA, Swords K, Davies HV, Belknap WR. The intragenic approach as a new extension to traditional plant breeding. *Trends Plant Sci* 2001; 12:397-403.
5. Binder KA, Wegner LH, Heidecker M, Zimmermann U. Gating of Cl⁻ currents in protoplast from the marine alga *Valonia utricularis* depends on the transmembrane Cl⁻ gradient and is affected by enzymatic cell wall degradation. *J Membr Biol* 2003; 191:165-78.
6. Cocking EC. A new method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 1960; 187:927-9.
7. Liu J, Xu X, Den X. Intergeneric somatic hybridization and its application to crop genetic improvement. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2005; 82:19-44.
8. Power JB, Davey MR, Anthony P, Lowe KC. Protoplast culture and regeneration. In: Goodman RM, ed. Encyclopaedia of plant and crop science. New York 2004:1065-8.
9. Anjum MA. Effect of protolast source and media on growth and regenerability of protoplast-derived calluses of *Solanum tuberosum* L. *Acta Physiol Plant* 1998; 20:129-33.
10. Dovzhenko A, Dal Bosco C, Meurer J, Koop HU. Efficient regeneration from cotyledon protoplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 2003; 222:107-11.
11. Szczerbakowa A, Borkowska M, Wielgat B. Plant regeneration from the protoplast of *Solanum tuberosum*, *S. nigrum* and *S. bulbocastanum*. *Acta Physiol Plant* 2000; 22: 3-10.
12. Przetakiewicz J, Nadolska-Orczyk A, Kuć D, Orczyk W. Tetraploid somatic hybrids (*Solanum tuberosum* L.) obtained from diploid breeding lines. *Cell Mol Biol Lett* 2007; 12:253-67.
13. Lillo C. Effects of media components and environmental factors on shoot formation from protoplast-derived calli of *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 1989; 19:103-11.
14. Briza J, Machova I. Regeneration of plants from leaf mesophyll protoplasts of the tetraploid potato cultivars Xenia and Bintje. *Biol Plant* 1991; 33:225-33.
15. Sun Y, Zhang X, Nie Y, Guo X. Production of fertile somatic hybrids of *Gossypium hirsutum* + *G. bicki* and *G. hirsutum* + *G. stockii* via protoplast fusion. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2005; 83:303-10.
16. Guo JM, Liu QC, Zhai H, Wang YP. Regeneration of plants from *Ipomoea cairica* L. protoplasts and production of somatic hybrids between *I. cairica* L. and sweetpotato, *I. batatas* (L.) Lam. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2006; 87:321-7.
17. Vasil V, Vasil IK. Isolation and culture of cereal protoplast. *Theor Appl Genet* 1980; 56:97-9.
18. Gumnadi SN, Panada T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases – a review. *Process Biochem* 2003; 38:987-96.
19. Doi RH, Tamaru Y. Clostridium cellulovorans cellulosome: an enzyme complex with plant cell wall degrading activity. *Chem Rec* 2001; 1:24-32.
20. Trabelsi S, Gargouri-Bouزيد R, Pedel F, Nato A, Lakhoua L, Drira N. Somatic hybrids between potato *Solanum tuberosum* and wild species *Solanum vernei* exhibit a recombination in the plastome. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2005; 83:1-11.
21. Rokka VM, Tauriainen A, Pietila L, Pehu E. Interspecific somatic hybrids between wild potato *Solanum acaule* Bitt. and anther-derived dihaploid potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Rep* 1998; 18:82-8.
22. Liu QC, Kokubu T, Sato M. Plant regeneration from *Ipomoea tirloba* L. protoplast. *Japan J Breed* 1991; 41:103-8.
23. Lightbourn GJ, Veilleux RE. Production and evaluation of somatic hybrids derived from monoploid potato. *Amer J Potato Res* 2007; 84:425-35.
24. Thieme R, Darsow U, Gavrilenko T, Dorokhov D, Tiemann H. Production of somatic hybrids between *S. tuberosum* L and late blight resistant Mexican wild potato species. *Euphytica* 1997; 97:189-200.
25. Moreira CD, Chase CD, Gmitter FG, Grosser JW. Transmission of organelle genomes in citrus somatic hybrids. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2000; 61:165-8.

26. Vasil V, Vasil IK. Isolation and culture of cereal protoplast. Part 2: Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*. Theor Appl Genet 1980; 56:97-9.
27. Sinha A, Wetten AC, Caligari PDS. Optimisation of protoplast production in white lupin. Biol Plant 2003; 47:21-5.
28. Mliki A, Jardask R, Reustle GM. Isolation and culture of leaf protoplast from Tunisian grapes. J Int Sci Vigne Vin 2003; 37:145-53.
29. Scarano MT, Abbate L, Ferrante S, Lucretti S, Tusa N. ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin. Plant Cell Rep 2002; 20:1162-6.
30. Orczyk W, Przetakiewicz J, Nadolska-Orczyk A. Somatic hybrids of *Solanum tuberosum* – application to genetics and breeding. Plant Cell Tiss Organ Cult 2003; 74:1-13.
31. Rakosy-Tican L, Hornok M, Menczel L. An improved procedure for protoplast microelectrofusion and culture of *Nicotiana tabacum* intraspecific somatic hybrids: plant regeneration and initial proofs on organelle segregation. Plant Cell Tiss Organ Cult 2001; 67:153-8.
32. Rotino GL, Sihachakr D, Rizza F, Vale G, Tacconi MG, Alberti P, Mennella G, Sabatini E, Toppino L, D'Alessandro A, Acciari N. Current status in production and utilization of dihaploids from somatic hybrids between eggplant (*Solanum melongena* L.) and its wild relatives. Acta Physiol Plant 2005; 27 (4B):723-33.
33. Rokka VM, Xu YS, Kankila A, Kuusela A, Pulli S, Pehu E. Identification of somatic hybrids of dihaploid *Solanum tuberosum* lines and *S. brevidens* by species specific RAPD patterns and assessment of disease resistance of the hybrids. Euphytica 1994; 80:207-17.
34. Rizza F, Menella G, Collonnier C, Sihachakr D, Kashyap V, Rajam MV, Prestera M, Rotino GL. Androgenic dihaploids from somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. aethiopicum* group gilo as a source of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*. Plant Cell Rep 2002; 20:1022-32.
35. Szczerbakowa A, Bołtowicz D, Lebecka R, Radomski P, Wielgat B. Characterization of the interspecific somatic hybrids *Solanum pinnatisectum* (+) *S. tuberosum* H-8105. Acta Physiol Plant 2005; 27 (3A):265-73.
36. Zhou C, Xia G, Zhi D, Chen Y. Genetic characterization of asymmetric somatic hybrids between *Bupleurum scorzoniferifolium* Willd and *Triticum aestivum* L.: potential application to the study of the wheat genome. Planta 2006; 223:714-24.
37. Pupilli E, Labombarda P, Arcioni S. New mitochondrial genome organization in three interspecific somatic hybrids of *Medicago sativa* including the parent-specific amplification of substoichiometric mitochondrial DNA units. Theor Appl Genet 2001; 103:972-78.
38. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 1962; 15:473-97.
39. Haberlach GT, Cohen BA, Baer MA, Towill LE, Helgeson JP. Isolation, culture and regeneration of protoplasts from potato several related *Solanum* species. Plant Sci 1985; 39:69-74.
40. Kao KN, Michayluk MR. Nutrient requirements of growth of *Vicia hajastana* cells and protoplast at very low density in liquid media. Planta 1975; 126:105-10.
41. Gamborg OL, Miller R, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 1968; 50:151-8.
42. Hunt GJ, Helgeson JP. A medium and simplified procedure for rowing single cells from *Solanum* species. Plant Sci 1989; 60:251-7.
43. Rokka VM, Xu YS, Tanhuanpaa P, Pietila L, Pehu E. Electrofusion of protoplast of anther-derived dihaploids lines of commercial potato cultivars. Agric Food Sci 1996; 5:449-60.
44. Szczerbakowa A, Bołtowicz D, Wielgat B. Interspecific somatic hybrids *Solanum bulbocastanum* (+) *S. tuberosum* H-8105. Acta Physiol Plant 2003; 25:365-73.
45. Bastia T, Carotenuto N, Basile B, Zoina A, Cardi T. Introduction of novel organelle DNA variation and transfer of resistance to frost and Verticillium wilt in *Solanum tuberosum* through somatic hybridization with 1EBN *S. commersonii*. Euphytica 2000; 116:1-10.
46. Cardi T. Multivariate analysis of variation among *Solanum commersonii* (+) *S. tuberosum* somatic hybrids with different ploidy levels. Euphytica 1998; 99:35-41.
47. Binsfeld PC, Schnabi H. Molecular and cytogenetic constitution of plants obtained via two different somatic hybridization methods. Plant Cell Rep 2002; 21:58-62.
48. Helgeson JP, Pohlman JD, Austin S, Haberlach GT, Wielgat SM, Ronis D, Zambolin L, Tooley P, McGrath JM, James RV, Stevenson WR. Somatic hybrids between *Solanum bulbocastanum* and potato: a new source of resistance to late blight. Theor Appl Genet 1998; 96:738-42.

49. Fock I, Collonnier C, Lavergne D, Vaniet S, Ambroise A, Luisetti J, Kodja H, Sihachakr D. Evaluation of somatic hybrids of potato with *Solanum stenotomum* after a long-term in vitro conservation. *Plant Physiol Biochem* 2007; 45:209-15.
50. Bastia T, Scotti N, Cardi T. Organelle DNA analysis of *Solanum* and *Brassica* somatic hybrids by PCR with 'universal primers'. *Theor Appl Genet* 2001; 102:1265-72.
51. Cheng YJ, Guo WW, Deng XX. Molecular characterization of cytoplasmic and nuclear genomes in phenotypically abnormal Valencia orange (*Citrus sinensis*) + Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia*) intergeneric somatic hybrids. *Plant Cell Rep* 2003; 21:445-51.
52. Szczebakowa A, Maciejewska U, Pawłowski P, Siekierski JS, Wielgat B. Electrofusion of protoplast from *Solanum tuberosum*, *S. nigrum* and *S. bulbocastanum*. *Acta Physiol Plant* 2001; 23:169-79.
53. Borgato L, Conicella C, Pisani F, Furini A. Production and characterization of arboreous and fertile *Solanum melongena* + *Solanum marginatum* somatic hybrid plants. *Planta* 2007; 226:961-9.
54. Deng J, Cui H, Zhi D, Zhou C, Xia G. Analysis of remote asymmetric somatic hybrids between common wheat and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 2007; 26:1233-41.
55. Liu J, Deng X. Regeneration and analysis of citrus interspecific mixoploid hybrid plants from asymmetric somatic hybridization. *Euphytica* 2002; 125:13-20.
56. Oberwalder B, Schilde-Rentschler L, Ruoß B, Wittemann S, Ninnemann H. Asymmetric protoplast fusions between wild species and breeding lines of potato – effect of recipients and genome stability. *Theor Appl Genet* 1998; 97:1347-54.
57. Xu XY, Hu ZY, Li JF, Liu JH, Deng XX. Asymmetric somatic hybridization between UV-irradiated *Citrus unshiu* and *C. sinensis*: regeneration and characterization of hybrid shoots. *Plant Cell Rep* 2007; 26:1263-73.
58. Rokka VM, Tauriainen A, Pietila L, Pehu E. Interspecific somatic hybrids between wild potato *Solanum acaule* Bitt. and anther-derived dihaploid potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Rep* 1998; 18:82-8.
59. Zimnoch-Guzowska E, Lebecka R, Kryszczuk A, Maciejewska U, Szczebakowa A, Wielgat B. Resistance to *Phytophthora infestans* in somatic hybrids of *Solanum nigrum* L. and diploid potato. *Theor Appl Genet* 2003; 107:43-8.
60. Rokka VM, Valkonen JPT, Pehu E. Production and characterization of haploids derived from somatic hybrids between *Solanum brevidens* and *S. tuberosum* through anther culture. *Plant Sci* 1995; 112:85-95.
61. Gavrilenko T, Thieme R, Heimbach U, Thieme T. Fertile somatic hybrids of *Solanum tuberosum* (+) dihaploid *Solanum tuberosum* and their backcrossing progenies: relationship of genome dosage with tuber development and resistance to potato virus Y. *Euphytica* 2003; 131:323-32.
62. Austin S, Pohlman JD, Brown CR, Mojtahedi H, Santo GS, Douches DS, Helgeson JP. Interspecific somatic hybridisation between *Solanum tuberosum* L. and *S. bulbocastanum* Dun. as a means of transferring nematode resistance. *Am Potato J* 1993; 70:485-95.
63. Bołtowiec D, Szczebakowa A, Wielgat B. RAPD analysis of the interspecific somatic hybrids *Solanum bulbocastanum* (+) *S. tuberosum*. *Cell Mol Biol Lett* 2005; 10:151-62.
64. Collonnier C, Fock I, Daunay MC, Servaes A, Vedel F, Siljak-Yakovlev S, Souvannavong V, Sihachakr D. Somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. sisymbirifolium*, as a useful source of resistance against bacterial and fungal wilts. *Plant Sci* 2003; 164:849-61.
65. Bidani A, Nouri-Ellouz O, Lakhous L, Sihachakr D, Cheniclet C, Mahjoub A, Drira N, Gargouri-Bouzid R. Interspecific potato somatic hybrids between *Solanum berthaultii* and *Solanum tuberosum* L. showed recombinant plastome and improved tolerance to salinity. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2007; 91:179-89.
66. Scotti N, Marechal-Drouard L, Cardi T. The *rpl5-rps14* mitochondrial region: a hot spot for DNA rearrangements in *Solanum* spp. somatic hybrids. *Curr Genet* 2004; 45:378-82.
67. Fock I, Collonnier C, Purwito A, Luisetti J, Souvannavong V, Vedel F, Servaes A, Ambroise A, Kodja H, Ducreux G, Sihachakr D. Resistance to bacterial wilt in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. *Plant Sci* 2000; 160: 165-76.
68. Butenko RG, Kuchko AA, Vitenko AA, Avetisov VA. Preparation and cultivation of isolated protoplast from the mesophyll of leaves of *S. tuberosum* L. and *S. chacoense* Bitt. *Plant Physiol* 1977; 24:660-6.
69. Shepard JF, Toten RE. Mesophyll cell protoplasts of potato: isolation, proliferation, and plant regeneration. *Plant Physiol* 1977; 60:313-16.
70. Melchers G, Sacristan MD, Holder AA. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res Comm* 1978; 43:203-18.

71. Hermsen JD, Taylor LM. Successful hybridization of non-tuberosus *Solanum etuberosum* LIND. and tuber-bearing *S. pinnatisectum* DUN. *Euphytica* 1979; 28:1-7.
72. Binding HSM, Jain, JFG, Mordhorst RN Gressel J. Somatic hybridization of an atrazine resistant biotype of *Solanum nigrum* and *S. tuberosum*. I. Clonal variation in morphology and in atrazine sensitivity. *Theor Appl Genet* 1982; 63:273-7.
73. Wielgat B, Wasilewska LD. Hybrydyzacja somatyczna pomiędzy dzikimi i uprawnymi gatunkami ziemniaka. *Biotechnologia* 2001; 2:9-15.
74. Rybczyński JJ. Poszerzanie zmienności genetycznej z wykorzystaniem somatycznej hybrydyzacji w obrębie *Gramineae*. *Biotechnologia* 2006; 4:136-44.
75. Szczerbakowa A. Międzygatunkowe mieszańce somatyczne ziemniaka. *Ziemniak Polski* 2008; 1:4-8.
76. Austin S, Baer MA, Helgeson JP. Transfer of resistance to potato leaf roll virus from *Solanum brevidentis* into *Solanum tuberosum* by somatic fusion. *Plant Sci* 1985; 39:75-82.
77. Pehu E, Gibson RW, Jones MKG, Kari A. Studies on the genetic basis of resistance to potato leaf roll virus, potato virus Y and potato virus X in *S. brevidentis* and *S. tuberosum*. *Plant Sci* 1990; 69:95-101.
78. McGrath JM, Williams CE, Haberlach GT, Wielgus SM, Uchytel TF, Helgeson JP. Introgression and stabilization of *Erwinia* tuber soft rot resistance into potato after somatic hybridisation of *Solanum tuberosum* and *S. brevidentis*. *Am J Potato Res* 2002; 79:19-24.
79. Helgeson JP, Haberlach GT, Ehlenfeldt MK, Hunt G, Pohlman JD, Austin S. Sexual progeny of somatic hybrids between potato and *Solanum brevidentis*: potential for use in breeding programs. *Am Potato J* 1993; 70:437-52.
80. Fock I, Collonnier C, Luisetti J, Purwito A, Souvannavong V, Vedel F, Servaes A, Ambroise A, Kodja H, Ducreux G, Sihachakr D. Use of *Solanum stenotomum* for introduction of resistance to bacterial wilt in somatic hybrids of potato. *Plant Physiol Biochem* 2001; 39:899-908.
81. Szczerbakowa A, Maciejewska U, Zimnoch-Guzowska E, Wielgat B. Somatic hybrids *Solanum nigrum* (+) *S. tuberosum*: morphological assessment and verification of hybridity. *Plant Cell Rep* 2003; 21:577-84.
82. Laferriere LT, Heleson JP, Allen C. Fertile *Solanum tuberosum* + *S. commersoni* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanasearum*. *Theor Appl Genet* 1999; 98:1272-8.
83. Carrasco A, De galarreta JIR, Rico A, Ritter E. Transfer of PLRV resistance from *Solanum verrucosum* Schlecht to potato (*S. tuberosum* L.) by protoplast electrofuzion. *Potato Res* 2000; 43:31-42.
84. Yamada T, Hosaka K, Nakagawa K, Kaide N, Misoo S, Kamijima O. Nuclear genome constitution and other characteristic of somatic hybrids between dihaploid *Solanum acaule* and tetraploid *S. tuberosum*. *Euphytica* 1998; 102:239-46.
85. Rokka VM, Laurila J, Tauriainen A, Laakso I, Larkka J, Metzler M, Pietilä L. Glycoalkaloid aglycone accumulations associated with infection by *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato species *Solanum acaule* and *Solanum tuberosum* and their interspecific somatic hybrids. *Plant Cell Rep* 2005; 23:683-91.
86. Thieme R, Rakosy-Tican E, Gavrilenko T, Antonova O, Schubert J, Nachtigall M, Udo Heimbach U, Thieme T. Novel somatic hybrids (*Solanum tuberosum* L. + *Solanum tarnii*) and their fertile BC₁ progenies express extreme resistance to potato virus Y and late blight. *Theor Appl Genet* 2008; (online) DOI 10.1007/s00122-007-0702-2.
87. Austin S, Ehlenfeldt MK, Baer MA, Helgeson JP. Somatic hybrids produced by protoplast fusion between *S. tuberosum* and *S. brevidentis*: phenotypic variation under field conditions. *Theor Appl Genet* 1986; 71:682-90.
88. Jakuczun H, Wasilewicz-Flis I, Przetakiewicz J, Orczyk W, Zimnoch-Guzowska E. Wykorzystanie fuzji somatycznej mieszańców diploidalnych *Solanum* do rozszerzenia puli hodowlanej ziemniaka (*Solanum tuberosum*). W: *Streszczenia. II Polski Kongres Genetyki*. Warszawa, 18–20 września 2007: 271.

CULTURE AND FUSION OF POTATO PROTOPLASTS

TOMASZ KOMOŃ*

Plant Breeding and Acclimatization Institute
Młochów Research Center
Platanowa 19
05-831 Młochów, Poland

*corresponding author: phone: +4822 729 90 27, fax: +4822 729 92 47, e-mail: tomek.komon@wp.pl

Summary

Plant protoplasts are a unique research base for modern biotechnology. They are used in scientific studies on function and organization of cells and genomes, transgenesis and biosynthesis of valuable organic compounds. Protoplasts in specially prepared and controlled conditions are able to join each other (fusion or hybridisation process), which leads to somatic hybrids formation. As a result of protoplasts fusion new combinations of nuclear and cytoplasmic genes, important for research and utilitarian purposes, are obtained. Somatic hybridization is widely applied in potato breeding and research. In this paper review of some important aspects concerning the methods of receiving potato protoplasts as well as somatic hybrids and their application in modern agriculture is presented.

Key words: protoplasts, protoplast fusion, somatic hybrids, potato