



Hybrydyzacja somatyczna pomiędzy dzikimi i uprawnymi gatunkami ziemniaka

Bernard Wielgat, Lidia D. Wasilewska

Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

Somatic hybridization between wild and cultivated *Solanum* species

Summary

Many of the wild species of *Solanum* possess high level of disease resistance to viruses, bacteria and pathogenic fungi that could be useful in potato breeding. Somatic hybridization technique enables introgression of those traits from related wild species into cultivated potato and appears to be very a useful means by which the sexual incompatibilities might be bypassed. The article discusses some aspects of potato somatic hybridization.

Key words:

potato, protoplasts, somatic hybridization, pathogen resistance.

1. Wprowadzenie

Poziom odporności roślin na chorobotwórcze wirusy, bakterie i grzyby jest zróżnicowany i zależy od ich cech dziedzicznych. Podwyższenie tego poziomu uzyskuje się na drodze genetycznego krzyżowania. Droga ta jest jednak kosztowna i czasochłonna, a jej zastosowanie ogranicza się do krzyżówek w obrębie tego samego lub wysoce spokrewnionych gatunków. W ostatnim dwudziestolecu bariery niekrzyżowalności zostały przełamane dzięki metodom inżynierii genetycznej (transformacja) oraz fuzji protoplastów (hybrydyzacja somatyczna).

W procesie transformacji możemy wprowadzić do genomu rośliny dowolny gen o znanej sekwencji. Do tej pory poznano sekwencje szeregu genów (geny R) warunkujących odporność na

Adres do korespondencji

Bernard Wielgat,
Instytut Biochemii
i Biofizyki,
Polska Akademia Nauk,
ul. Pawińskiego 5A,
02-106 Warszawa;
e-mail: wielgat@ibb.waw.pl

patogeny roślinne (1). Jednak wektorowa transformacja genomów organelli cytoplazmatycznych nie jest jeszcze praktycznie możliwa do wykonania. Natomiast przeniesienie genów drogą hybrydyzacji somatycznej pozwala na wyeliminowanie niektórych niedogodności związanych z metodami transformacji oraz na wykorzystanie olbrzymich zasobów genowych roślin dziko rosnących z pominięciem barier gatunkowych.

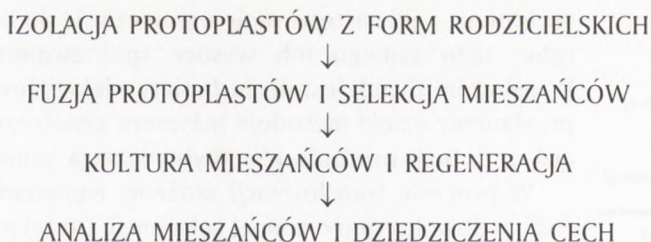
Rodzaj *Solanum* zawiera około 900 dzikich gatunków, z których 235 wytwarza bulwy (2). Wiele z tych gatunków posiada cechy odporności na choroby oraz szereg innych cech szczególnie użytecznych w uprawie ziemniaka (*Solanum tuberosum*) (2,3). Od ponad dwudziestu lat prowadzone są, z różnym powodzeniem, próby uzyskiwania mieszańców powstałych w wyniku fuzji protoplastów izolowanych z *S. tuberosum* z protoplastami otrzymywanymi z dzikich gatunków takich jak *Solanum nigrum*, *S. brevidens*, *S. acaule*, *S. etuberosum*, *S. bulbocastanum*, *S. commersonii*, *S. pinnatisectum*, *S. chacoense*, *S. phureja*, *S. papita* i in. (4). Gatunki te mogą być dawcą cech odporności na wirusy PLRV, PVY i PVX (5,6), bakterie *Erwinia* spp. (7) i *Ralstonia solanacearum*. (8) oraz zarazę ziemniaczaną (*Phytophthora infestans*) (9-11).

W pracy przedstawiono możliwości przenoszenia cech odporności na choroby z gatunków dzikich do ziemniaka uprawnego metodami hybrydyzacji somatycznej.

2. Techniki stosowane w hybrydyzacji somatycznej

Zarówno uprawne jak i dzikie gatunki ziemniaka charakteryzują się dużą zmiennością ploidalności; od występujących w większości diploidów ($2n = 2x = 24$) do heksaploidów ($2n = 6x = 72$) (2). Ta heterogenność prowadzi do bardzo zróżnicowanej zdolności do regeneracji *in vitro*. Zdolność ta jest właściwością zmienną i zależy od gatunku, odmiany, linii, a nawet od warunków hodowli roślin rodzicielskich i rodzaju tkanki użytej do izolacji protoplastów. Z tego względu procedury stosowane w procesie hybrydyzacji ziemniaka są opracowywane eksperymentalnie dla wybranych gatunków i tkanek ziemniaka.

Głównymi etapami hybrydyzacji somatycznej są:



Izolacja protoplastów nie stanowi obecnie większych problemów metodycznych. Można je otrzymywać z dowolnej tkanki ziemniaka przy zastosowaniu optymalnych dla niej warunków izolacji, składu i stężeń enzymów trawiących ściany komórkowe (12,13). Protoplasty używane do fuzji często izoluje się z mezofilu liści ziemniaka. Z tkanki tej można uzyskać wysoką wydajność (ok. 1×10^6 komórek/1g świeżej tkanki) żywotnych protoplastów, co jest istotne w procesie fuzji (13,15). Proces ten wymaga zapewnienia fizjologicznych warunków fuzji (odpowiednie stężenia soli), optymalnej gęstości protoplastów (10^5 - 10^6 komórek/1 ml mieszaniny) i czynników indukujących łączenie komórek. Ze względu na te czynniki wyróżnia się dwie podstawowe metody fuzji: chemiczną, z użyciem fuzjogennego działania glikolu polietylenowego (PEG) i fizyczną, wykorzystującą działanie pola elektrycznego – elektrofuzja (5,14,15).

W procesie fuzji otrzymujemy mieszaninę komórek nie połączonych, homokarionów i heterokarionów. Liczba powstałych heterokarionów wynosi zwykle od kilku do kilkunastu procent użytych do fuzji protoplastów. Powstaje zatem konieczność ich selekcji z użyciem metod wykorzystujących różnice w zabarwieniu i fluorescencji (barwniki naturalne i przyżyciowe), zróżnicowanego wzrostu na pożywkach selekcyjnych, cytometrii przepływowej itp. (16). W późniejszych stadiach kultury fuzantów można prowadzić ich selekcję na podstawie różnic morfologicznych i wigoru kalusów. W identyfikacji i analizie mieszańców komórek i roślin stosuje się markery DNA z użyciem technik RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych) i RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – losowo wzmacniany polimorfizm DNA), wzory izoenzymatyczne (zymogramy), oraz analizę morfologiczną uzyskanych roślin (16,17).

Postęp w uzyskiwaniu mieszańców somatycznych jest uzależniony głównie od rozwoju technik *in vitro*. Wszystkie prace związane z fuzją protoplastów, kulturą fuzantów i regeneracją mieszańców są prowadzone metodami *in vitro*. Z wielu dzikich gatunków ziemniaka jest niezmiernie trudno uzyskać kulturę kalusa, a następnie jego różnicowanie w roślinę. Trudności te są wynikiem różnego poziomu totipotencji komórek rodzicielskich oraz nieoptymalnego składu pożywek i regulatorów wzrostu (17). Formy rodzicielskie ziemniaka, zarówno gatunków uprawnych jak i dzikich, wymagają zatem ich dokładnej charakterystyki genetycznej oraz potencjału regeneracyjnego *in vitro*. Genomy mieszańców zawierają bowiem nie tylko interesujące nas cechy wartościowe (np. odporność na choroby), ale również i cechy niepożądane w hodowli. Kolejne etapy badań polegają zatem na analizie i eliminacji cech negatywnych z zachowaniem cech pozytywnych dla rośliny uprawnej.

3. Mieszańce somatyczne ziemniaka

W 1977 r. po raz pierwszy Butenko i wsp. (18) oraz Shepard i Toten (19) przeprowadzili udaną próbę izolacji protoplastów z mezofilu liści ziemniaka i regenerację

z nich roślin. W rok później Melchers i wsp. (20) dokonali fuzji protoplastów izolowanych z *S. tuberosum*, a w 1979 r. Hermsen i Taylor (21) uzyskali mieszańce somatyczne drogą fuzji protoplastów izolowanych z dzikich gatunków ziemniaka (*S. etuberosum* + *S. pinnatisectum*). Z kolei Binding i wsp. (22) uzyskując przeniesienie cechy odporności na herbicyd atrazynę z dzikiego gatunku *S. nigrum* do *S. tuberosum*, wskazali na potencjalne znaczenie fuzji protoplastów w hodowli ziemniaka. Pojawiła się zatem szansa przenoszenia genów, odpowiedzialnych za wiele cech pozytywnych bez szczegółowej ich charakterystyki molekularnej.

Istotnym elementem fuzji jest również możliwość wymiany organelli cytoplazmatycznych. Podczas łączenia się dwu protoplastów, a przed pierwszym podziałem mitotycznym, zachodzą procesy rekombinacji i, w różnym stopniu, eliminacji chromosomów obu partnerów. W tym samym czasie następuje również proces segregacji organelli łącznie z, lub bez rekombinacji DNA tych struktur cytoplazmatycznych. Kemble i wsp. (23) w 1986 r. wykryli nowe fragmenty restrykcyjne mtDNA w mieszańcu *S. tuberosum* + *S. brevidens*, które nie występowały w mitochondriach rodzicielskich. Wyniki te wskazywały na występowanie podczas fuzji rekombinacji mtDNA. Pojawiła się możliwość tworzenia nie tylko mieszańców symetrycznych i asymetrycznych, lecz również i cybrydów, które zawierają genom jądrowy jednego partnera i mieszaninę plastydów i mitochondrii drugiego partnera (16). Tworzenie nowych kombinacji jądrowych, jądrowo-cytoplazmatycznych i cytoplazmatycznych, z pominięciem pre- i postzygotycznych barier występujących podczas krzyżowania genotypowego dzikich i uprawnych gatunków ziemniaka, dotyczy przede wszystkim próby uzyskania mieszańców odpornych na choroby wirusowe, bakteryjne i grzybowe.

3.1. Patogeny ziemniaka

Wirusy takie jak PRLV, PVY, PVX i PVM wywołują liczne choroby ziemniaka. Odmianny ziemniaka i jego linie filogenetycznie starsze charakteryzują się wyższym poziomem odporności na patogeny, gdyż często były one produktem krzyżówek z formami dzikimi (24). Geny odporności u gatunków dzikich są zatem przedmiotem ich celowego wprowadzania do genomu ziemniaka uprawnego.

Wykazano, że *S. demissum* i *S. acaule* posiadają geny warunkujące odporność typu HR (*Hypersensitive Response* – nadwrażliwość) przeciw wirusowi PRLV, a odporność poligeniczna na ten wirus występuje w *S. etuberosum* i *S. brevidens*. Z kolei gatunki *S. phureja*, *S. chacoense*, *S. demissum* i *S. stoloniferum* posiadają geny odporności przeciw PVY i PVA. Cechy odporności na wirusy PVX i PVM występują w takich gatunkach jak *S. chacoense*, *S. acaule*, *S. microdontum* i *S. andigena* (24).

Bakterie wywołujące choroby ziemniaka są reprezentowane przez trzy grupy: *Erwinia* (*E. carotovora* i *E. chrysanthemi*), *Ralstonia solanacearum* (poprzednia nazwa *Pseudomonas*) i *Clavibacter michiganensis*. Do tej pory nie jest jasny mechanizm odporności ziemniaka na te bakterie. Wiadomo jednak, że takie gatunki jak *S. phureja*,

S. sparsipilum, *S. chacoense*, *S. microdontum* i *S. brevidens* wykazują cechy odporności na niektóre szczepy tych bakterii (25).

Zaraza ziemniaczana jest chorobą liści i bulw ziemniaka wywołaną przez grzyb *Phytophthora infestans*. Grzyb ten jest znany już od połowy XIX w. i jest on najlepiej poznanym czynnikiem chorobotwórczym ziemniaka. W około 100 dzikich gatunkach *Solanum* wykazano odporność na *P. infestans* (3). Z dotychczasowych prac wynika, że mechanizmy odporności na ten grzyb są wielorakie. Wykazano zarówno odporność typu HR jak i odporność poligeniczną. Poznanie interakcji patogen – ziemniak oraz molekularnych mechanizmów odporności komplikuje ogromna zmienność różnych izolatów patogena jak również różnice w ploidalności ziemniaka. Wykorzystanie tu hybrydyzacji somatycznej przyczynia się zatem zarówno do poznania mechanizmów odporności jak i wzbogacenia genomu ziemniaka o wartościowe cechy istotne w jego uprawie.

3.2. Odporność na patogeny w mieszańcach somatycznych ziemniaka

Wprowadzanie cech odporności z gatunków dzikich do uprawnych, drogą hybrydyzacji somatycznej, podejmuje się stale w wielu laboratoriach światowych. Jednakże liczba uzyskiwanych mieszańców somatycznych ziemniaka, z potwierdzoną cechą odporności, jest niewielka w porównaniu z ilością przeprowadzonych eksperymentów. Liczba gatunków dzikich używanych jako dawcy cech odporności jest nieliczna. Większość z tych gatunków posiada geny odporności jednocześnie przeciw kilku patogenom. Uzyskane dotychczas mieszańce somatyczne ziemniaka zawierają cechy odporności na większość znanych chorób wywołanych przez wirusy, bakterie i grzyby (tab. 1).

Uzyskanie mieszańców somatycznych ziemniaka z tak dużą liczbą cech wartościowych jest niewątpliwym osiągnięciem wielu grup badawczych. W procesie fuzji przenoszone są jednak z gatunków dzikich również cechy nieprzydatne w hodowli. Eliminację tych negatywnych cech można prowadzić poprzez tzw. krzyżowanie wsteczne (*back-crossing*) ziemniaka uprawnego z uzyskanym mieszańcem, o ile nie jest on sterylny. Stosuje się również metodę ograniczonego przenoszenia genomu jądrowego z gatunków dzikich (fuzja asymetryczna) poprzez naświetlanie promieniami jonizującymi ich protoplastów przed fuzją. W wyniku fuzji takich protoplastów, ze zdegradowanym częściowo DNA, z protoplastami *S. tuberosum* można uzyskać mieszańce o ograniczonej zawartości genomu gatunków dzikich (36).

Gatunki dzikie ziemniaka o niższej ploidalności (diploidy) są bardziej preferowanym partnerem fuzji, niż gatunki o wysokiej ploidalności. W naszych badaniach uzyskaliśmy jednakże mieszańce somatyczne heksaploidalnego *S. nigrum* z dwoma diploidalnymi liniami (ZEL-1136 i H-8105) i tetraploidalną odmianą Bzura *S. tuberosum*. *S. nigrum* jest bardzo odporny na *P. infestans*, podczas gdy linie *S. tuberosum* są wrażliwe na ten grzyb. Uzyskano szereg mieszańców, potwierdzonych molekularną analizą

RAPD, które posiadały wysoką odporność na *P. infestans*. Mieszzańce te zawiązywały również struktury bulwopodobne, pomimo że *S. nigrum* nie zawiązuje bulw (32,33). Wyniki te wskazują na możliwość konstruowania mieszańców międzygatunkowych, bez względu na ich poziom ploidalności, o wysokiej odporności na patogeny.

Postęp w hybrydyzacji somatycznej jest uwarunkowany poznaniem lokalizacji genów niosących cechy, np. odporności na patogeny oraz poznaniem molekularnych mechanizmów obronnych rośliny wywołanych atakiem patogena lub czynnikami stresowymi (37,38).

Tabela 1

Cechy odporności mieszańców somatycznych otrzymanych w wyniku fuzji protoplastów izolowanych z *S. tuberosum* i gatunków dzikich

Gatunki rodzicielskie	Odporność	Literatura
<i>S. tuberosum</i> + <i>S. brevidens</i>	na wirus PRLV	(5)
	na wirus PRLV, PVY, PVX	(26,27)
<i>S. tuberosum</i> + <i>S. etuberosum</i>	na wirus PVY	(28,29)
<i>S. tuberosum</i> + <i>S. acaule</i>	na wirus PVX	(6)
<i>S. tuberosum</i> + <i>S. brevidens</i>	na bakterie <i>Erwinia</i> spp.	(7,30)
<i>S. tuberosum</i> + <i>S. commersonii</i>	na bakterie <i>Ralstonia solanacearum</i>	(8)
<i>S. tuberosum</i> + <i>S. brevidens</i>	na <i>P. infestans</i>	(10,31)
<i>S. tuberosum</i> + <i>S. bulbocastanum</i>	na <i>P. infestans</i>	(11,32)
<i>S. tuberosum</i> + <i>S. circaeifolium</i>	na <i>P. infestans</i>	(9)
<i>S. tuberosum</i> + <i>S. nigrum</i>	na <i>P. infestans</i>	(32,33)
<i>S. tuberosum</i> + <i>S. nigrum</i>	na herbicyd atrazynę	(22)
<i>S. tuberosum</i> + <i>S. bulbocastanum</i>	na nicienie	(34)
<i>S. tuberosum</i> + <i>S. commersonii</i>	na przymrozki	(35)

4. Podsumowanie

1. Hybrydyzacja somatyczna jest drogą umożliwiającą przenoszenie cech wartościowych, takich jak odporność na choroby, z gatunków dzikich do ziemniaka uprawnego z pominięciem krzyżowania generatywnego.

2. Uzyskanie mieszańców somatycznych zależy od użytych gatunków oraz opracowania optymalnych dla nich warunków izolacji i kultury protoplastów, fuzji i selekcji oraz regeneracji roślin.

Literatura

1. Krzymowska M., (1998), Postępy Biochemii, 44, 318-325.
2. Hawkes J. G., (1994), *Potato Genetics*, Eds. Bradshaw J. E., Mackay G. R., 3-42, CAB International, Wallingford.
3. Umaerus V., Umaerus M., (1994), *Potato Genetics*, Eds. Bradshaw J. E., Mackay G. R., 365-401, CHB International, Wallingford.

4. Helgeson J. P., Haberlach G. T., (1999), *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century*, Eds. Altman A., Ziv M., Izhar S., 151-154, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
5. Austin S., Baer M. A., Helgeson J. P., (1985), *Plant Science*, 39, 75-82.
6. Yamada T., Misoo S., Ishii T., Takaoka K., Kamijima O., (1997), *Breeding Science*, 47, 229-236.
7. Austin S., Lojkowska E., Ehlenfeldt M. K., Kelman A., Helgeson J. P., (1988), *Phytopathology*, 78, 1216-1220.
8. Laferriere L. T., Helgeson J. P., Allen C., (1999), *Theor. Appl. Genet.*, 98, 1272-1278.
9. Mattheij W. M., Eijlander R., de Koning J. R. A., Louwes K. M., (1992), *Theor. Appl. Genet.*, 83, 459-466.
10. Rokka V. M., Xu Y. S., Kankila J., Kuusela A., Pulli S., Pehu E., (1994), *Euphytica*, 80, 207-217.
11. Helgeson J. P., Pohlman J. D., Austin S., Haberlach G. T., Wielgus S. M., Ronis D., Zambolim L., Tooley P., McGrath J. M., James R. V., Stevenson W. R., (1998), *Theor. Appl. Genet.*, 96, 738-742.
12. Haberlach G. T., Cohen B. A., Baer M. A., Towill L. E., Helgeson J. P., (1985), *Plant Science*, 39, 67-74.
13. Szczerbakowa A., Borkowska M., Wielgat B., (2000), *Acta Physiol. Plant.*, 22, 3-10.
14. Jones M. G. K., (1988), *Trends Biotechnol.*, 6, 153-158.
15. Szczerbakowa A., Maciejewska U., Pawłowski P., Skierski J. S., Wielgat B., (2001), *Acta Physiol. Plant.*, 23.
16. Michalik B., (1996), *Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin*, red. Michalik B., 36-49, Drukrol S.C., Kraków.
17. Morikawa H., Yamada Y., (1992), *Plant Biotechnology: comprehensive biotechnology*, Eds. Fowler M. W., Warren G. S., Woo-Young M., 199-222, Pergamon Press, New York.
18. Butenko R. G., Kuchko A. A., Vitenko A. A., Avetisov V. A., (1977), *Fizjol. Rast.*, 24, 660-665.
19. Shepard J. F., Toten R. E., (1977), *Plant Physiol.*, 60, 313-316.
20. Melchers G., Sacristan M. D., Holder A. A., (1978), *Carlsberg Res. Comm.*, 43, 203-218.
21. Hermesen J. G. Th., Taylor L. M., (1979), *Euphytica*, 28, 1-7.
22. Binding H., Jain S. M., Finger J., Mordhorst G., Nehls R., Gressel J., (1982), *Theor. Appl. Genet.*, 63, 273-277.
23. Kemble R. J., Barsby T. L., Wong R. S. C., Shepard J. F., (1986), *Theor. Appl. Genet.*, 72, 787-793.
24. Świeżyński K. M., (1994), *Potato Genetics*, Eds. Bradshaw J. E., Mackay G. R., 339-364, CAB International, Wallingford.
25. Elphinstone J. G., (1994), *Potato Genetics*, Eds. Bradshaw J. E., Mackay G. R., 429-446, CAB International, Wallingford.
26. Pehu E., Gibson R. W., Jones M. G. K., Karp A., (1990), *Plant Science*, 69, 95-101.
27. Valkonen J. P. T., Xu Y. S., Rokka V. M., Pulli S., Pehu E., (1994), *Ann. Appl. Biol.*, 124, 351-362.
28. Novy R. G., Helgeson J. P., (1994), *Theor. Appl. Genet.*, 89, 783-786.
29. Thieme R., Gavrilenko T., Thieme T., Heimbach U., (1999), *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century*, Eds. Altman A., Ziv M., Izhar S., 557-560, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
30. Allefes J. J. H. M., van Dooijeweert W., de Jong E. R., Prummel W., Hoogendoorn J., (1995), *Potato Research*, 38, 11-21.
31. Helgeson J. P., Hunt G. J., Haberlach G. T., Austin S., (1986), *Plant Cell Rep.*, 3, 212-214.
32. Wielgat B., Szczerbakowa A., (1999), *I Krajowy Kongres Biotechnologii, Referaty*, 59-60, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.
33. Szczerbakowa A., Maciejewska U., Wielgat B., Gawroński M., Kryszczuk A., Zimnoch-Guzowska E., (2000), *EAPR-EUCARPIA SECTION MEETING, Breeding research for resistance to pathogens and quality traits, Materials, Materials*, Warsaw, Poland, 41.
34. Austin S., Pohlman J. D., Brown C. R., Mojtahedi H., Santo G. S., Douches D. S., Helgeson J. P., (1993), *American Potato J.*, 70, 485-495.
35. Nyman M., Warra S., (1997), *Theor. Appl. Genet.*, 97, 1127-1132.
36. Oberwalder B., Schilde-Rentschler L., Ruoss B., Wittemann S., Ninnemann H., (1998), *Theor. Appl. Genet.*, 97, 1347-1354.
37. Ebel J., Mithofer A., (1998), *Planta*, 206, 335-348.
38. Chetelat R. T., Meglic V., (2000), *Theor. Appl. Genet.*, 100, 232-241.