



III KONGRES
BIOTECHNOLOGII



Biotechnologia w hodowli ziemniaka

Waldemar Marczewski

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Młochów

Biotechnology in potato breeding

Summary

Potato has been known in Europe for the past 400 years. Potato breeding began after the global *Phytophthora infestans* epidemics in 1840 and 1841. The first breeding attempts were to increase the *P. infestans* resistance in cultivated potato. In the 21st century, new potato cultivars have been evaluated for more than 50 traits, both for disease and pest resistance, and significant tuber traits. Modern potato breeding requires biotechnology. Cell and tissue culture, genetic engineering and DNA-based molecular markers are the most promising areas of molecular biology for potato breeding. However, there are few reports indicating the actual use of biotechnology in potato breeding programs. Cisgenesis and DNA markers that reside within resistance genes or physically close to them and identified in a fully automated system are a chance for the progress in the future.

Key words:

potato, breeding, transgenesis, cisgenesis, MAS.

1. Wprowadzenie

W Ameryce Południowej historia uprawy ziemniaka liczy więcej niż 2500 lat. Spośród ponad 200. znanych gatunków *Solanum*, siedem to gatunki uprawne. Dwa podgatunki *S. tuberosum*: *andigena* i *tuberosum*, sprowadzone do Europy w drugiej połowie XVI w., uważa się za przodków współczesnego ziemniaka uprawnego. W XIX w. ziemniak był już ważną rośliną uprawną w zachodniej Europie. Na tyle istotną, że klęska nieurodzaju, związana z dewastującym rozprzestrzenieniem się zarazy ziemniaka (*Phytophthora infestans*) w latach 1840-1841, doprowadziła do głodu, śmierci ponad miliona ludzi i masowej emigracji „za chlebem”. Paradok-

Adres do korespondencji

Waldemar Marczewski,
Instytut Hodowli
i Aklimatyzacji Roślin,
ul. Platanowa 19,
05-831 Młochów.

biotechnologia

2 (81) 20–26 2008

salnie stała się bodźcem do rozwoju hodowli ziemniaka. Priorytetem było rozszerzenie wąskiej puli genetycznej ziemniaka uprawnego o geny odporności pochodzące z dzikich gatunków *Solanum*, w pierwszej kolejności odporności na *P. infestans*. Z czasem rozszerzono badania w kierunku odporności na wirusy, bakterie i szkodniki (1-3). W szczególności przydatne dla hodowli okazały się krzyżowania interploidalne $4x \times 2x$, stosowane do dziś, gdy zachodzi potrzeba przeniesienia potencjału genetycznego z diploidalnych gatunków *Solanum* na poziom tetraploidalny, właściwy dla ziemniaka uprawnego. Wiek XX to czas niewątpliwych sukcesów w hodowli ziemniaka. Jednak z dzisiejszej perspektywy, postęp hodowlany uzyskiwany metodami konwencjonalnymi w ziemniaku przebiega zbyt wolno. Wprowadzenie jednego genu z gatunku dzikiego i uzyskanie odmiany w tradycyjnej hodowli trwa zwykle kilkanaście lat.

Tymczasem nowoczesna odmiana ziemniaka jest waloryzowana pod względem ponad 50. cech agronomicznych, jakościowych i odpornościowych. Osiągnięcie szybkiego efektu hodowlanego wiąże się nie tylko z kumulowaniem genów, ale także monitorowaniem negatywnych związków między cechami. W zależności od celu użytkowania funkcjonują programy hodowli ziemniaka jadalnego i ziemniaka dla przetwórstwa. Bez biotechnologii osiągnięcie znaczącego postępu jest już niemożliwe. W hodowli zachowawczej ziemniaka powszechnie wykorzystuje się kultury *in vitro* do przechowywania genotypów, kriokonserwacji merystemów ziemniaka, pyłku, nasion, odwirusowania materiałów matecznych (4,5). Opracowano technologie *in vitro* do szybkiego mnożenia materiałów matecznych. Na rynku działają firmy specjalizujące się w produkcji sadzeniaków wolnych od patogenów (<http://www.quantumtubers.com/>). W hodowli twórczej biotechnologia kojarzy się głównie z fuzją protoplastów, transgenezą i markerami DNA ułatwiającymi prowadzenie selekcji (MAS, ang. *marker-assisted selection*). Technika fuzji protoplastów jest stosowana do łączenia genomów dihaploidów lub diploidów ziemniaka, fuzjonowania mieszańców międzyrodzajowych i różnych gatunków *Solanum* (5,6). Jednak droga do uzyskania odmian, jak się wydaje, jest jeszcze odległa.

2. Transgeneza ziemniaka w hodowli odpornościowej

Transformacje ziemniaka są czynione przede wszystkim z potrzeby uzyskania roślin odpornych lub z podniesioną odpornością na patogeny i szkodniki oraz w programach badawczych związanych z modyfikacjami cech jakościowych ziemniaka przeznaczonego dla przetwórstwa (7). Geny *Rpi-blb1* (8) i *Rpi-blb2* (9) z dzikiego gatunku *S. bulbocastanum* wprowadzono z użyciem *Agrobacterium tumefaciens* do ziemniaka uprawnego. W efekcie odporność transformowanych roślin na *P. infestans* zdecydowanie wzrosła. Poprawę odporności na ten najważniejszy patogen ziemniaka, a także na *P. erythroseptica*, uzyskano dzięki nadekspresji genu temporyny A (*temporin A*) (10). Udokumentowano wzrost odporności ziemniaka na *Verticillium dahliae* (11)

i *Botritis cinerea* (12) po wprowadzeniu genu kodującego peptyd defensynę (*defensin*). Wyższa aktywność enzymu oksydazy glukozy (*glucose oxidase*) miała pozytywny wpływ na odporność ziemniaka na bakterię *Erwinia carotovora* (13). Obiecujące okazało się wykorzystanie zjawiska posttranskrypcyjnego wyciszenia genu (PTGS, ang. *post-transcriptional gene silencing*) do podniesienia odporności ziemniaka na wirus Y ziemniaka (PVY, ang. *Potato virus Y*) (14).

Zacytowane prace to tylko wybrane przykłady z wielu opisanych w literaturze efektów transformacji genetycznych, które nie przełożyły się, jak dotąd, na sukces komercyjny. W hodowli odpornościowej ziemniaka takich sukcesów jest niewiele. Te najbardziej znane to wprowadzenie przez firmę Monsanto w latach 90. ubiegłego wieku do produkcji towarowej odmian NewLeaf Y i NewLeaf Plus odpornych na PVY oraz wirus liściozwoju ziemniaka (PLRV, *Potato leafroll virus*), które posiadały dodatkowo gen *Bt* warunkujący odporność roślin na stonkę ziemniaczaną (15).

3. Transgeneza ziemniaka a metabolizm węglowodanów

Skrobia jest najważniejszym węglowodanem wykorzystywanym przez człowieka do celów konsumpcyjnych i nieżywnościowych (16). Skrobia ziemniaczana jest wykorzystywana m.in. w przemyśle spożywczym, włókienniczym, kosmetycznym i farmaceutycznym. Oprócz zawartości skrobi ważna jest jej jakość. Przetwórstwo potrzebuje odmian ziemniaka, charakteryzujących się odpowiednią wielkością ziaren skrobi (17,18).

Wymogiem wielu technologii przemysłowych jest rozdzielenie amylozy i amylopektyny, dwóch naturalnych polimerów tworzących ziarna skrobi. Są to technologie bardzo kosztowne. Dla przetwórstwa spożywczego ziemniaka poważnym problemem jest zjawisko *cold sweetening*. W uśpionych bulwach ziemniaka, w trakcie przechowywania, następuje powolna degradacja skrobi na rzecz syntezy sacharozy, jako źródła energii w procesach glikolizy i oddychania komórkowego. Im niższa temperatura, tym wyższa akumulacja sacharozy, ulegającej rozkładowi do cukrów redukujących: glukozy i fruktozy. Podczas procesów przetwórczych grupy aldehydowe cukrów redukujących wchodzi w reakcję z wolnymi grupami aminowymi aminokwasów i białek, czego skutkiem jest ciemnienie uzyskanych produktów.

Metabolizm skrobi w ziemniaku jest dobrze poznany, posiadamy wiedzę o wzajemnej równowadze syntezy i rozpadu skrobi. Zidentyfikowano kilkanaście enzymów uczestniczących bezpośrednio lub pośrednio w metabolizmie cukrów, poznało ich aktywność, sposoby regulacji, formy izoenzymatyczne, lokalizację subkomórkową (19-21). Od początku lat 90. ubiegłego wieku czyniono próby transformacji genetycznych w ziemniaku, ukierunkowane zarówno na podniesienie zawartości skrobi w bulwach i obniżenie poziomu cukrów redukujących, jak i uzyskanie skrobi zmodyfikowanej, o lepszych właściwościach fizykochemicznych dla przemysłu przetwórczego. Wzrost aktywności transportera ATP/ADP (*ATP/ADP transporter*) (22) oraz

nadekspresja genu kinazy adenylowej (ang. *adenylate kinase*) (23) w amyloplastach przelożyły się na istotny wzrost zawartości skrobi w bulwach ziemniaka. Zjawisko ang. *cold sweetening* zminimalizowano po wprowadzeniu do ziemniaka genu inhibitora inwertazy z tytoniu (24). Szczególnie ważne okazały się badania enzymu GBSS (ang. *granule-bound starch synthase*) istotnego dla poziomu amylopektyny (25) i dwóch izoform SBE (ang. *starch branching enzyme*) regulujących syntezę amylozy (26,27). Sukces komercyjny osiągnięto w połowie lat 90. W Holandii wprowadzono do produkcji odmiany ziemniaka Apriori i Apropos, posiadające gen *GBSS* w orientacji *antisens*. Uzyskano tym sposobem ziemniaki wytwarzające w bulwach skrobię bezamylozową.

Wśród innych molekularnych modyfikacji ziemniaka na uwagę zasługują próby wykorzystania tego gatunku do wytwarzania substancji przydatnych w przemyśle farmaceutycznym, jednak jeszcze bez efektu komercyjnego (7,28,29).

4. Odmiany transgeniczne ziemniaka w produkcji towarowej

Produkcja towarowa odmian transgenicznych, zarówno odpornych na PVY i PLRV, jak i „bezamylozowych” nie trwała długo. Ogólnoświatowa kampania anty-GMO wymusiła na producentach rezygnację z uprawy ziemniaków genetycznie zmodyfikowanych w Holandii w 2000 r. (7), a w Ameryce Północnej w 2001 r. (15). W 2007 r. nastąpiła zmiana stanowiska Komisji Europejskiej. Dopuszczono do uprawy, jako produkt koncernu BASF, odmianę Amflora z zablokowaną ekspresją genu *GBSS*. Zgoda Komisji dotyczy uprawy zmodyfikowanej odmiany tylko na potrzeby przemysłu nieżywnościowego (<http://www.corporate.basf.com>). Środowisko biotechnologów roślin intensywnie zabiega, aby wprowadzić do Dyrektywy 2001/18/EC Unii Europejskiej zapis, zgodnie z którym cisgeneza będzie, obok mutagenyzy i fuzjonowania protoplastów, akceptowaną prawnie metodą modyfikacji roślin uprawnych (30). Cisgeneza odnosi się do przenoszenia genów w orientacji *sens* między gatunkami, które w naturze mogą się krzyżować (31).

5. Markery DNA w hodowli ziemniaka

Wprowadzenie do hodowli ziemniaka markerów molekularnych, zwłaszcza tych generowanych przy zastosowaniu łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, ang. *polymerase chain reaction*), stworzyło nowe możliwości prowadzenia selekcji. Użycie markerów DNA może sprawić, że dobór form rodzicielskich do krzyżowań będzie efektywniejszy i łatwiejsze stanie się kumulowanie genów wybranych cech monogenicznych (5). O przydatności markera DNA dla praktyki hodowlanej decyduje jego silne sprzężenie z monitorowanym genem, stabilne w kolejnych generacjach. Nie bez znaczenia są koszty stosowania metody molekularnej w porównaniu z klasycznymi testami

diagnostycznymi. Zastosowanie markerów DNA do selekcji będzie szczególnie wskazane dla cech, których ocena na podstawie reakcji fenotypu jest kosztowna, długotrwała i zależna od wielu czynników środowiskowych, bądź też niemożliwa do wykonania z uwagi na brak właściwej metody diagnostycznej. Metoda molekularna powinna być łatwa w wykonaniu i przydatna do oceny materiałów hodowlanych pochodzących z różnych puli genetycznych.

Historia lokalizowania markerów DNA na mapie genetycznej ziemniaka liczy prawie 20 lat (32,33). Zidentyfikowano setki różnego rodzaju sekwencji markerowych. Wiele z nich to markery sprzężone z ważnymi dla hodowli genami oraz loci cech ilościowych (QTL, ang. *quantitative trait loci*). Największy postęp osiągnięto w identyfikacji czynników genetycznych determinujących odporność ziemniaka na patogeny i szkodniki oraz niektóre cechy użytkowe (3,34,35). Jednak przykładów wdrożeń markerów molekularnych do praktyki hodowlanej jest niewiele (3). Marker RYSC3 sprzężony z genem *Ry_{adg}* zastosowano do selekcji w hodowli ziemniaka odpornego na PVY (36). Marker GP122 sprzężony z genem *Ry_{f_{sto}}* determinującym również odporność na PVY jest wykorzystywany przynajmniej w kilku hodowlach europejskich (37). Marker GP94 genu *Rpi-phu1*, który warunkuje odporność na *P. infestans* (38), jest przydatny do selekcji w syntezie materiałów wyjściowych ziemniaka w IHAR Młochów. W celu obniżenia kosztów testu molekularnego opracowano metodę *multiplex PCR* do detekcji markerów DNA sprzężonych z genami *Ry_{f_{sto}}* i *Ns*, co pozwala na jednoczesne i skuteczne monitorowanie obecności alleli odporności na PVY i wirus S ziemniaka (PVS, ang. *Potato virus S*) (39).

Szansą na poszerzenie spektrum markerów DNA stosowanych w MAS w hodowli ziemniaka jest identyfikacja sekwencji markerowych w obrębie genów lub będących z nimi w silnym, fizycznym sprzężeniu (34). Przydatna okazała się genomika translacyjna (ang. *translational genomics*), która odnosi się do wykorzystania wiedzy molekularnej o gatunkach modelowych do badań gatunków uprawnych (40). Przykładem są markery COSII (ang. *single-copy orthologs*), opracowane na podstawie sekwencji ulegających ekspresji (EST, ang. *expressed sequence tag*) w *Arabidopsis thaliana*, a wykorzystane do mapowania genomów z rodziny *Solanaceae* (41).

Dla hodowcy monitorowanie obecności pojedynczych genów jest ważne. Jednak o nowej jakości w hodowli gatunków uprawnych będzie można mówić, wtedy gdy uda się skorelować fenotypową zmienność cechy poligenicznej ze zróżnicowaniem w sekwencjach determinujących ją genów (42). Strategia genów kandydujących (ang. *candidate gene approach*) i mapowanie asocjacyjne (ang. *association mapping*) to nowe podejścia badawcze, które stwarzają szansę na identyfikację korzystnych alleli lub kombinacji alleli dla cechy wielogenowej i mogą przyczynić się do zrozumienia, dlaczego w pewnych warunkach środowiskowych zachodzi ekspresja określonych genów, a w innych nie (43,44). W ziemniaku można oczekiwać, że wiedza o odporności polowej na *P. infestans*, ilości i jakości skrobi, genach determinujących wysokość plonu i poziom cukrów redukujących w bulwach okaże się niebawem przydatna także dla praktyki hodowlanej (45-48). Hodowla nowej odmiany rozpoczyna

się od doboru form rodzicielskich do krzyżowania, w wyniku którego uzyskuje się ponad 100 000 siewek do oceny (3). Na jakim etapie hodowli należy przeprowadzać selekcję przy użyciu markerów molekularnych? Podjęcie właściwej decyzji będzie łatwiejsze z chwilą automatyzacji detekcji markerów DNA (49). Konieczne stanie się dostosowanie dotychczasowych schematów hodowlanych do nowych procedur prowadzenia selekcji, z uwzględnieniem zaawansowanych narzędzi informatycznych (3,50).

Literatura

1. Dale M. F. B., Bradshaw J. E., (2006), *Potato developments in a changing Europe*, Eds. N. U. Haase, A. J. Haverkort, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, 36-45.
2. Acquaah G., (2007), *Principles of plant genetics and breeding*, Ed. G. Acquaah, Blackwell Publishers, Oxford, UK, chapter 33.
3. Milbourne D., Pande B., Bryan G., (2007), *Genome mapping and molecular breeding in plants*, vol 3, Ed. C. Kole, Springer Publishers, 205-236.
4. Gebhardt C., Tacke E., Schuchmann R., (2000), *Plant Breed. Seed Sci.*, 44, 95-103.
5. Wenzel G., Ros B., (2006), *Potato developments in a changing Europe*, Eds. N. U. Haase, A. J. Haverkort, Wageningen Academic Publishers, 25-35.
6. Szczerbakowa A., Boltowicz D., Lebecka R., Radomski P., Wielgat B., (2005), *Acta Physiol. Plant.*, 27, 265-273.
7. Zimnoch-Guzowska E., Zimny J., Sowa S., (2004), *Zesz. Prob. Nauk Rol.*, 500, 21-30.
8. van der Vossen E., Sikkema A., te Lintel Hekkert B., Gros J., Stevens P., Muskens M., Wouters D., Pereira A., Stiekema W., Allefs S., (2003), *Plant J.*, 36, 867-882.
9. van der Vossen E., Gros J., Sikkema A., Muskens M., Wouters D., Wolters P., Pereira A., Allefs S., (2005), *Plant J.*, 44, 208-222.
10. Osusky M., Osuska L., Hancock R. E., Kay W. W., Misra S., (2004), *Transgenic Res.*, 13, 181-190.
11. Gao A. G., Hakimi S. M., Mittanck C. A., Wu Y., Woerner B. M., Stark D. M., Shah D. M., Liang J., Rommens C. M. T., (2000), *Nature Biotech.*, 18, 1307-1310.
12. Khan R. S., Nishihara M., Yamamura S., Nakamura I., Mii M., (2006), *Plant Biotechnol.*, 23, 179-183.
13. Wu B. J., Shortt E. B., Lawrence E. B., Levine K., Fitzsimmons C., Shah D. M., (1995), *Plant Cell*, 7, 1357-1368.
14. Missiou A., Kalantidis K., Boutla A., Tzortzakaki S., Tabler M., Tsagris M., (2004), *Mol. Breeding*, 14, 185-197.
15. Kaniewski W. K., Thomas P. E., (2004), *AgBioForum*, 7, 41-46.
16. Slattery C. J., Kavakli I. H., Okita T. W., (2000), *Trends Plant Sci.*, 5, 291-298.
17. Leszczyński W., (2004), *Zeszyty Probl. Nauk Rol.*, 500, 69-98.
18. Nowacki W., (2004), *Zesz. Prob. Nauk Rol.*, 500, 45-56.
19. Sowokinos J. R., (2001), *Am. J. Potato Res.*, 78, 221-236.
20. Finlay M. B., Bradshaw J. E., (2003), *Trends Plant Sci.*, 8 (7), 310-312.
21. Solomos T., Mattoo A. K., (2005), *Genetic improvement of Solanaceous crops*, Eds. M. K. Razdan, A. K. Mattoo, vol I, Sci. Publishers, Inc., Enfield, USA, 209-234.
22. Tjaden J., Möhlmann T., Kampfenkel K., Henrichs G., Neuhaus H. E., (1998), *The Plant J.*, 16, 531-540.
23. Regierer B., Fernie A. R., Springer F., Perez-Melis A., Leisse A, Koehl K., Willmitzer L., Geigenberger P., Kossmann J., (2002), *Nature Biotech.*, 20, 1256-1260.
24. Greiner S., Rausch T., Sonnewald U., Herbers K., (1999), *Nature Biotech.*, 17, 708-711.
25. Visser R. G. F., Somhorst I., Kuipers G. J., Ruys N. J., Feenstra W. J., Jacobsen E., (1991), *Mol. Gen. Genet.*, 225, 289-296.

26. Schwall G. P., Safford R., Westcott R. J., Jeffcoat R., Tayal A., Shi Y. C., Gidley M. J., Jobling S. A., (2000), *Nature Biotech.*, 18, 551-554.
27. Jobling S. A., Westcott R. J., Tayal A., Jeffcoat R., Schwall G. P., (2002), *Nature*, 20, 295-299.
28. Bradshaw J. E., Bryan G. J., Ramsay G., (2006), *Potato Res.*, 49, 49-65.
29. Mullins E., Milbourne D., Petti C., Doyle-Prestwich B. M., Meade C., (2006), *Trends Plant Sci.*, 11, 254-260.
30. Schouten H. J., Krens F. A., Jacobsen E., (2006), *EMBO Rep.*, 7, 750-753.
31. Jacobsen E., Hutten R., (2006), *Potato developments in a changing Europe*, Eds. N. U. Haase, A. J., Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, 46-54.
32. Bonierbale M., Plaisted R. L., Tanksley S. D., (1988), *Genetics*, 120, 1095-1103.
33. Gebhardt C., Ritter E., Debener T., Schachtschabel U., Walkemeier B., Uhrig H., Salamini F., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, 78, 65-75.
34. Gebhardt C., Valkonen J. P. T., (2001), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 39, 79-102.
35. Barone A., (2004), *Am. J. Potato Res.*, 81, 111-117.
36. Kasai K., Morikawa Y., Sorri V. A., Valkonen J. P. T., Gebhardt C., Watanabe K. N., (2000), *Genome*, 43, 1-8.
37. Flis B., Hennig J., Strzelczyk-Żyta D., Gebhardt C., Marczewski W., (2005), *Mol. Breeding*, 15, 95-101.
38. Śliwka J., Jakuczun H., Lebecka R., Marczewski W., Gebhardt C., Zimnoch-Guzowska E., (2006), *Theor. Appl. Genet.*, 113, 685-695.
39. Witek K., Strzelczyk-Żyta D., Hennig J., Marczewski W., (2006), *Mol. Breeding*, 18, 273-275.
40. Salentijn E. M. J., Pereira A., Angenent G. C., van der Linden C. G., Krens F., Smulders M. J. M., Vosman B., (2007), *Mol. Breeding*, 20, 1-13.
41. Wu F., Mueller L. A., Crouzillat D., Pétiard V., Tanksley S. D., (2006), *Genetics*, 174, 1407-1420.
42. Morgante M., Salamini F., (2003), *Curr. Opin. Biotech.*, 14, 214-219.
43. Pflieger S., Lefebvre V., Causse M., (2001), *Mol. Breeding*, 7, 275-291.
44. Simko I., (2004), *Trends Plant Sci.*, 9, 441-448.
45. Chen X., Salamini F., Gebhardt C., (2001), *Theor. Appl. Genet.*, 102, 284-295.
46. Menendez C. M., Ritter E., Schafer-Pregl R., Walkemeier B., Kalde A., Salamini F., Gebhardt C., (2002), *Genetics*, 162, 1423-1434.
47. Bormann C. A., Rickert A. M., Castillo Ruiz R. A., Paal J., Lübeck J., Strahwald J., Buhr K., Gebhardt C., (2004), *MPMI*, 17, 1126-1138.
48. Gebhardt C., Ballvora A., Walkemeier B., Oberhagemann P., Schüler K., (2004), *Mol. Breeding*, 13, 93-102.
49. Dayteg C., Tuvešson S., Merker A., Jahoor A., Kolodynska-Brantesyam A., (2007), *Plant Breeding*, 126, 410-415.
50. Collard B. C. Y., Jahufer M. Z. Z., Brouwer J. B., Pang E. C. K., (2005), *Euphytica*, 142, 169-196.