

Anna Majewska-Sawka

*Zakład Genetyki i Hodowli Roślin Korzeniowych Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
Oddział w Bydgoszczy*

Zastosowanie techniki protoplastów *in vitro* w hodowli roślin – osiągnięcia, problemy i perspektywy*

1. Wstęp

Izolacja protoplastów w wyniku enzymatycznego trawienia tkanek roślinnych stała się rutynową procedurą laboratoryjną we wczesnych latach sześćdziesiątych [5]. Zastosowanie enzymów pochodzenia grzybowego wpłynęło na łatwość uzyskiwania dużej liczby protoplastów, a w konsekwencji umożliwiło intensyfikację badań nad ich regeneracją w warunkach *in vitro*. Pierwsze normalnie wykształcone rośliny otrzymano z mezofilowych protoplastów tytoniu [46], co stanowiło istotny przełom w konwencjonalnych metodach hodowli roślin. W kolejnych latach prowadzono zatem intensywne zabiegi selekcyjne zmierzające do pozyskiwania totipotentnych protoplastów poszczególnych gatunków i ich regeneracji w warunkach *in vitro*. Przewidywano, że kultura protoplastów stanie się nie tylko metodą odtwarzania określonych genotypów na skalę masową, ale przede wszystkim pozwoli na zwiększenie zmienności genetycznej form uprawnych na skutek indukcji zmian dziedzicznych w fazie *in vitro* [24, 25, 34, 39]. Zakładano również, że procedura ta przyczyni się do uzyskania roślin poliploidalnych poprzez spontaniczne fuzje protoplastów lub poliploidyzację tkanki kalusowej [23, 51]. W ciągu kolejnych lat liczba gatunków, dla których uzyskano regeneranty z protoplastów, sukcesywnie wzrastała. Do połowy lat 80. opracowano warunki somatycznej embriogenezy lub morfogenezy z protoplastów około 100 gatunków [24], a na początku lat 90. lista ta objęła już ponad 300 roślin [48]. Sukcesy w badaniach *in vitro* stworzyły duże nadzieje na wykorzystanie kultury i fuzji protoplastów w pracach nad uzyskaniem nowych form uprawnych [8, 9].

Rezultaty wieloletnich badań wykazały jednak, że część roślin odtworzonych z protoplastów wykazuje niepożądaną zmienność somaklonalną lub inne zaburzenia natury fizjologicznej, które uniemożliwiają ich wykorzystanie w pracach hodowla-

* Praca wykonana została w ramach projektu KBN 5 S301 018 07

nych. Nieprawidłowości rozwojowe obejmują m.in. powstawanie roślin albinotycznych, karłowatych czy niepłodnych [48, 50, 51]. Dodatkowym problemem okazała się niemożność indukcji embriogenezy czy morfogenezy z tkanek kalusowych uzyskanych z protoplastów niektórych gatunków [21, 24, 48]. Obiecującym materiałem wyjściowym do modyfikacji genetycznych okazały się natomiast liczne rośliny w obrębie *Solanaceae*, *Gramineae*, *Cruciferae* i *Citrus*. Izolacja protoplastów z wytypowanych gatunków i ich regeneracja w rośliny nie była jednak ostatecznym zamierzeniem, lecz stanowiła niezbędny punkt wyjściowy do dalszych prac genetycznych z zastosowaniem technik hybrydyzacji somatycznej [34, 37]. Liczne prace eksperymentalne skoncentrowały się zatem na pozyskaniu totipotentnych protoplastów, które mogłyby zostać wykorzystane do fuzji międzygatunkowych. W ostatnich 20 latach przeprowadzono wiele eksperymentów w tej dziedzinie, a niektóre z podjętych prób zostały uwieńczone powodzeniem, doprowadzając do wytworzenia roślin o charakterze mieszańcowym [14, 27].

Lata osiemdziesiąte i dziewięćdziesiąte to okres intensywnych badań zmierzających do wykorzystania techniki protoplastów w konkretnych programach hodowlanych [30, 34, 36, 48], których główne cele obejmują:

- syntezę poliploidów o dobrych cechach użytkowych,
- wytwarzanie form allopoloidalnych o szerszej bazie genetycznej niż formy wyjściowe,
- wprowadzanie cech kodowanych w genomie mitochondrialnym i chloroplastowym innych gatunków,
- przenoszenie do genomu biorcy pojedynczych chromosomów lub ich fragmentów zawierających geny odporności na choroby czy stresowe warunki środowiska.

2. Hybrydyzacja somatyczna

Technika ta pozwala na łączenie protoplastów pochodzących z dowolnych komórek somatycznych dwóch roślin rodzicielskich o różnej przynależności taksonomicznej, zatem już w założeniu umożliwia stworzenie mieszańców zawierających bogatszy zestaw genów niż w wypadku łączenia komórek płciowych. Fuzja może mieć charakter symetryczny, gdy obejmuje dwa pełne genomy rodzicielskie, lub asymetryczny, kiedy następuje łączenie pełnego genomu jednego z rodziców z niepełnym genomem drugiego albo też łączenie dwóch niepełnych genomów. Powodzenie hybrydyzacji somatycznej zależy jest od wielu czynników, przede wszystkim od odległości taksonomicznej dzielącej rodzicielskie gatunki roślin.

2.1. Hybrydyzacja symetryczna

Liczne przykłady literaturowe dokumentują, iż następstwa symetrycznej fuzji protoplastów są trudne do przewidzenia, a uzyskiwane efekty nie zawsze są zgodne

z oczekiwaniami. Stosunkowo nieczęsto zdarza się, że dwa połączone w wyniku fuzji genomy zostają na stałe zintegrowane ze sobą, a wytworzone mieszańce są formami w pełni poliploidalnymi lub alloploidalnymi. Przykładem efektywnej hybrydyzacji somatycznej pozwalającej na przełamanie niezgodności płciowej jest fuzja protoplastów *Petunia hybrida* ($2n = 14$) + *Petunia variabilis* ($2n = 18$) i wytworzenie amfidiploidalnych roślin mieszańcowych ($2n = 32$) o nowym kolorze kwiatów i odmiennej morfologii płatków korony [45]. Udało się również otrzymać syntetyczną formę *Brassica carinata* ($2n = 34$) w wyniku fuzji protoplastów *Brassica nigra* ($2n = 16$) i *Brassica oleracea* ($2n = 18$). Formy *B. carinata*, odporne na suszę i infekcje grzybowe, występują co prawda w warunkach naturalnych w Kenii i Etiopii, są jednak mało zróżnicowane genetycznie i zawsze zawierają cytoplazmę *B. nigra* [33]. W wielu wypadkach efektem przeprowadzonej fuzji symetrycznej było wytworzenie zróżnicowanych form mieszańcowych, wśród których spotykano zarówno czyste poliploidy, jak też formy o nieco wyższej lub nieco niższej liczbie chromosomów niż suma chromosomów gatunków wyjściowych. Przykłady obejmują liczne rośliny z rodziny *Solanaceae*, *Cruciferae* i *Citrus* [15, 19, 22, 29, 43, 50]. W wyniku fuzji protoplastów *Solanum tuberosum* ($2n = 24$) + *Solanum phureja* ($2n = 24$) uzyskano zarówno tetraploidy (o charakterze hybrydowym i jednorodzielskim), jak też liczne rośliny o wyższym stopniu ploidalności. Jeden z tetraploidalnych klonów hybrydowych charakteryzował się trzykrotnie wyższym plonem bulw ziemniacznych w stosunku do obydwu form rodzicielskich i stanowi obecnie obiecujący materiał hodowlany [26].

Hybrydyzacja somatyczna gatunków znacznie oddalonych taksonomicznie często wiąże się z częściową lub całkowitą eliminacją chromosomów jednej z form rodzicielskich [37]. Kierunek tej eliminacji jest trudny do przewidzenia, a liczba odrzuconych chromosomów jest zmienna w różnych klonach powstałych w wyniku tej samej fuzji. Stanowi to poważne utrudnienie w pracach nad ukierunkowanymi modyfikacjami genetycznymi. Przykładem jest powstanie mieszańców aneuploidalnych ($2n = 52$) w wyniku fuzji *Dianthus chinensis* ($2n = 30$) i *Dianthus barbatus* ($2n = 30$), które poza zaburzeniami w płodności pyłku charakteryzowały się również niekorzystnymi cechami rozwojowymi, tzn. karłowatym wzrostem i przyspieszonym kwitnieniem w fazie *in vitro* [31]. Podobne nieprawidłowości wykazywały też mieszańce *Dianthus barbatus* i *Gypsophilia paniculata* [32]. W wypadkach skrajnych eliminacji ulega prawie cały genom jednej z form wyjściowych, jak np. w wyniku fuzji *Nicotiana tabacum* ($2n = 48$) i *Atropa belladonna* ($2n = 72$), gdy poza mieszańcami symetrycznymi otrzymano również liczne rośliny o morfologii *N. tabacum* zawierające jeden dodatkowy chromosom z *A. belladonna* [2]. Rzadziej zdarza się, że wyeliminowane zostają pojedyncze chromosomy obydwu gatunków wyjściowych, jak np. w wyniku fuzji *Solanum tuberosum* ($2n = 24$) i *Nicotiana plumbaginifolia* ($2n = 20$) [12]. Okazało się również, że uzyskane klony hybrydowe były niestabilne genetycznie i w czasie hodowli *in vitro* wykazywały stopniowe zmiany kariotypowe [13].

Niepożądane efekty towarzyszące symetrycznej hybrydyzacji somatycznej obejmują zatem wiele elementów natury genetycznej, które wiążą się z niezgodnością genomów jądrowych i cytoplazmatycznych. W konsekwencji powodują zaburzenia płodności mieszańców lub ich całkowitą sterylność, niemożność wyeliminowania cech niepożądanych poprzez krzyżowanie wypierające, a często także niestabilność genetyczną [3]. Problemy te, jak również niemożność przewidzenia efektów fuzji symetrycznej stały się powodem poszukiwania nowych rozwiązań, które zapewniłyby bardziej ukierunkowany i kontrolowany przebieg hybrydyzacji somatycznej, a w rezultacie – tworzenie większej liczby mieszańców o pożądanym cechach użytkowych.

2.2. Hybrydyzacja asymetryczna

Możliwość ukierunkowanej eliminacji chromosomów stwarza metoda fuzji asymetrycznej, polegająca na łączeniu niepełnych genomów form rodzicielskich i regeneracji roślin cybrydowych. Efekt eliminacji materiału jądrowego uzyskuje się stosując kilka metod: (1) naświetlanie protoplastów donorowych promieniami X, γ lub UV [17, 18, 37], (2) wirowanie protoplastów w eksperymentalnie dobranym gradiencie cukrów bądź też (3) plazmolizę protoplastów podczas izolacji [44]. Promieniowanie jonizujące (X, γ) i niejonizujące (UV) wywołuje uszkodzenia DNA, a w następstwie usunięcie poszczególnych chromosomów lub ich fragmentów podczas kolejnych podziałów mitotycznych. O ile metoda ta zapewnia eliminację jądrowego DNA w protoplastach wybranej formy rodzicielskiej, o tyle nie pozwala przewidzieć stopnia eliminacji chromosomów. Proces ten nie jest bowiem skorelowany z intensywnością czy czasem naświetlania, a ponadto jego przebieg różni się w kolejnych powtórzeniach eksperymentu [3]. Przydatność metody fuzji asymetrycznej musi być zatem określona eksperymentalnie, na podstawie analizy kariotypu i ekspresji cech użytkowych w konkretnych mieszańcach. Znane są liczne przykłady zarówno pozytywnych, jak też negatywnych efektów łączenia protoplastów jednego gatunku z asymetrycznymi protoplastami lub cytoplazmami drugiego.

Próba przeniesienia odporności na niską temperaturę – kodowanej w genomie chloroplastowym *Brassica oleracea* – do cytoplazmatycznie męskosterylnej (CMS) formy kalafiora została uwieńczona powodzeniem. Zastosowanie promieni γ spowodowało całkowitą eliminację jądrowego DNA *B. oleracea*, a wytworzone cybrydy były diploidami, które zawierały mitochondria warunkujące cechę CMS i chloroplasty z genami odporności na niską temperaturę. Obydwie cechy były przekazywane potomstwu [49].

Pozytywne rezultaty uzyskano również w wyniku fuzji asymetrycznych protoplastów transgenicznej linii *Brassica nigra* niosącej geny odporności na dwa patogeny – *Phoma lingam* i *Plasmodiophora brassicae* – z protoplastami *Brassica napus*. Ponad

52% zregenerowanych mieszańców charakteryzowało się odpornością na *P. lingam*, a 23% – na *P. brassicae* [11].

Innym przykładem doskonałych efektów praktycznych, będących wynikiem fuzji asymetrycznej, jest przeniesienie odporności na kiłę kapuścianą z *Raphanus sativus* ($2n = 18$) do *Brassica oleracea* ($2n = 18$). Zregenerowane rośliny zawierały od 35 do 62 chromosomów, wiele z nich okazało się jednak czystymi tetraploidami ($2n = 36$) odpornymi na kiłę i wykazującymi pośredni kształt liści i znacznie większe kwiaty niż formy rodzicielskie. Mieszańce te zawiązały nasiona – zarówno w wyniku samozapylenia, jak też krzyżowania wstecznego – które po wykiełkowaniu dały początek normalnym roślinom [16].

Wytworzono również mieszańce somatyczne ziemniaka, które wykazywały odporność na bakterie z rodzaju *Erwinia*. Linie hodowlane powstałe na bazie tych mieszańców są aktualnie wykorzystywane w Wielkiej Brytanii, Francji i Stanach Zjednoczonych [22].

Dobre rezultaty uzyskano w pracach nad indukcją cytoplazmatycznej męskiej sterylności w roślinach płodnych lub nad przeniesieniem tej cechy z innych gatunków. Procedura uzyskiwania nowych roślin CMS wymaga inaktywacji jądrowego DNA (promienie X, γ lub UV) w protoplastach jednego z rodziców i chemicznej inaktywacji organellowego DNA w protoplastach drugiej formy rodzicielskiej, a następnie fuzji asymetrycznych komponentów i regeneracji cybrydów [6]. Męskosterylne rośliny pomidora powstały w następstwie asymetrycznej fuzji protoplastów dwóch płodnych form, tzn. *Lycopersicon esculentum* ($2n = 24$) i *Solanum acaule* ($2n = 4x = 48$) oraz *Lycopersicon esculentum* i *Solanum tuberosum* ($2n = 4x = 48$). Wytworzone cybrydy nie różniły się morfologicznie, fizjologicznie i pod względem liczby chromosomów od wyjściowych form pomidora, wykazywały natomiast zróżnicowane symptomy męskiej sterylności. Analiza mtDNA mieszańców potwierdziła, że jest on odmienny od mtDNA rodziców [28].

Przeniesienie CMS z gatunków dzikich lub uprawnych do ich płodnych odpowiedników opisano u kilku gatunków roślin z rodziny *Cruciferae*, *Solanaceae* i *Gramineae* [20, 35, 42]. Fuzja cytoplazmatów męskosterylnej formy *Raphanus sativus* i protoplastów *Brassica napus* doprowadziła do wytworzenia diploidalnych lub aneuploidalnych roślin mieszańcowych, wśród których znaleziono również sterylne, o nowych wzorcach mtDNA [40]. Na podobnej zasadzie wprowadzono cechę CMS do kilku odmian ryżu, m.in. Sasanishiki, uzyskując jej stałą ekspresję w kolejnych pokoleniach roślin [1]. W niektórych wypadkach otrzymano jedynie tkankę kalusową o charakterze hybrydowym lub cybrydowym [6, 55].

Próby przeniesienia odporności na choroby wirusowe z dzikiego gatunku ziemniaka *Solanum brevidens* ($2n = 20$) do *Solanum tuberosum* ($2n = 24$) nie przyniosły jak dotąd zadowalających rezultatów. Pomimo stosowania różnych typów promieniowania (γ , X) powstałe mieszańce posiadały zróżnicowaną liczbę chromosomów – od 31 do 64 – i były genetycznie niestabilne [10, 38, 53, 54]. Nieliczne formy wykazujące

odporność na infekcje wirusem Y charakteryzowały się bardzo słabym wzrostem korzeni i brakiem bulw [53]. Trwają jednak prace nad określeniem stopnia odporności innych mieszańców ziemniaka na choroby wirusowe. Być może pozwolą one na wyłonienie nowych cennych dla hodowli materiałów [29, 30].

Negatywne efekty obserwowano także w wypadku łączenia niepełnego genomu zmutowanej, odpornej na herbicydy formy *Arabidopsis thaliana* z protoplastami *Brassica napus*. Powstałe mieszańce wykazywały, co prawda, odporność na herbicydy, wytwarzały jednak nienormalne kwiaty i były całkowicie sterylne [4].

3. Osiągnięcia, problemy i perspektywy

Postęp w pracach nad modyfikacją genetyczną protoplastów roślinnych zaznaczył się szczególnie wyraźnie w ostatnim dziesięcioleciu. Stał się możliwy dzięki opracowaniu licznych systemów regeneracji dla gatunków uznawanych przez długi czas za niezwykle trudne pod względem manipulacji *in vitro*. Do spektakularnych osiągnięć w tym zakresie należy opracowanie efektywnej metody regeneracji protoplastów pszenicy [47], niektórych roślin motylkowych [48], a także gatunków drzewiastych [7, 34, 37]. W wielu wypadkach procedura ta stała się rutynowym elementem szerszych programów badawczych obejmujących wewnątrz- i międzygatunkową hybrydyzację somatyczną [30, 34, 48]. Odnotowano tutaj wiele sukcesów, szczególnie w odniesieniu do przełamywania barier niekrzyżowalności i wytwarzania nowych form poli- lub allopoloidalnych o korzystniejszych cechach użytkowych. Należą do nich rośliny ozdobne o nowej barwie kwiatów [34, 45], tetraploidalne mieszańce ziemniaka charakteryzujące się bardzo wysokim plonem bulw [26, 48] czy mieszańce roślin cytrusowych stanowiące komponenty triploidalnych odmian bezpestkowych [15, 34]. Ponadto w wielu wypadkach opracowano szczegółowe protokoły przeniesienia do roślin uprawnych genów jądrowych, chloroplastowych i mitochondrialnych z innych gatunków lub form dzikich. Modyfikacje takie stały się możliwe dzięki rozwojowi metod fuzji asymetrycznej. Zaowocowały wytworzeniem roślin odpornych na patogeny oraz stresowe warunki środowiska. Uzyskano także wiele mieszańców cytoplazmatycznie męskosterylnych, stanowiących cenne komponenty w hodowli heterozyjnej. Wiodące prace w tej dziedzinie obejmują głównie gatunki z rodziny *Solanaceae*, *Cruciferae* i *Gramineae* [30, 37, 48].

Z drugiej strony nie można pominąć licznych danych eksperymentalnych wskazujących, iż uzyskiwane efekty modyfikacji genetycznych protoplastów nie zawsze odpowiadają teoretycznym założeniom [52]. Główne problemy dotyczą roślin mieszańcowych o zaburzonej płodności pyłku lub też całkowicie sterylnych [3, 49]. Powszechnym zjawiskiem jest również powstawanie hybrydów o nieustabilizowanej liczbie chromosomów [3] oraz prezentujących gorsze walory użytkowe niż formy rodzicielskie.

Można przypuszczać, że przyszłe badania dotyczące modyfikacji genetycznej roślin będą zmierzały do rozwoju alternatywnych metod wprowadzania DNA do genomu biorcy [41] i ich lepszego dostosowania do wymagań poszczególnych gatunków. Szeroki zakres prac przy zastosowaniu tradycyjnych metod zaowocuje prawdopodobnie większą liczbą gatunków zmienionych genetycznie. Postęp w badaniach podstawowych, wykorzystujących nowoczesne metody biologii i genetyki molekularnej, przyczyni się z pewnością do lepszego poznania mechanizmów uczestniczących w integracji genomów w następstwie hybrydyzacji somatycznej.

Literatura

- [1] Akagi H., Taguchi T., Fujimura T. 1995. Stable inheritance and expression of the CMS traits introduced by asymmetric protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 91: 563–567.
- [2] Babiychuk E., Kushnir S., Gleba Y.Y. 1992. Spontaneous extensive chromosome elimination in somatic hybrids between somatically congruent species *Nicotiana tabacum* L. and *Atropa belladonna* L. *Theor. Appl. Genet.* 84: 87–91.
- [3] Bates G.W. 1992. Molecular analysis of nuclear genes in somatic hybrids. *Physiol. Plant.* 85: 308–314.
- [4] Bauer-Weston B., Keller W., Webb J., Gleddie S. 1993. Production and characterization of asymmetric somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* 86: 150–158.
- [5] Cocking A.C. 1960. A method for isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187: 927–929.
- [6] Creemers-Molenaar J., Hall R.D., Krens F.A. 1992. Asymmetric protoplasts fusion aimed at intraspecific transfer of cytoplasmic male sterility (CMS) in *Lolium perenne* L. *Theor. Appl. Genet.* 84: 763–770.
- [7] Egertsdotter U., von Arnold S. 1993. Classification of embryogenic cell-lines of *Picea abies* as regards protoplast isolation and culture. *J. Plant Physiol.* 141: 222–229.
- [8] Evans D.A., Wetter R.L., Gamborg O.L. 1980. Somatic hybrid plants of *Nicotiana glauca* and *Nicotiana tabacum* obtained by protoplast fusion. *Physiol. Plant.* 48: 225–230.
- [9] Evans D.A., Bravo J.E., Kut S.A., Flick C.E. 1983. Genetic behaviour in somatic hybrids in the genus *Nicotiana*: *N. otophora* (x) *N. tabacum* and *N. sylvestris* (x) *N. tabacum*. *Theor. Appl. Genet.* 64: 93–101.
- [10] Feher A., Preiszner J., Litkey Z., Csanadi G., Dudits D. 1992. Characterization of chromosome instability in interspecific somatic hybrids obtained by X-ray fusion between potato (*Solanum tuberosum* L.) and *S. brevidens* Phil. *Theor. Appl. Genet.* 84: 880–890.
- [11] Gerdemann-Knorck M., Sacristan M.D., Braatz C., Schieder O. 1994. Utilization of asymmetric somatic hybridization for the transfer of disease resistance from *Brassica nigra* to *Brassica napus*. *Plant Breed.* 113: 106–113.
- [12] Gilissen L.J.W., van Staveren M.J., Verhoeven H.A., Sree Ramulu K. 1992. Somatic hybridization between potato and *Nicotiana plumbaginifolia*. 1. Spontaneous biparental chromosome elimination and production of asymmetric hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 84: 73–80.
- [13] Gilissen L.J.W., van Staveren M.J., Ennik E., Verhoeven H.A., Sree Ramulu K. 1992. Somatic hybridization between potato and *Nicotiana plumbaginifolia*. 2. Karyotypic modification and segregation of genetic markers in hybrid suspension cultures and sublines. *Theor. Appl. Genet.* 84: 81–86.

- [14] Gleba Y.Y., Momot V.P., Cherep N.N., Skarzynskaya M.V. 1982. Intertribal hybrid cell lines of *Atropa belladonna* (x) *Nicotiana chinensis* obtained by cloning individual protoplasts fusion products. *Theor. Appl. Genet.* 62: 75–79.
- [15] Grosser J.W., Mourao-Fo F.A.A., Gmitter F.G., Louzada E.S., Jiang J., Baergen K., Quiros A., Cabasson C., Schell J.I., Chandler J.L. 1996. Allotetraploid hybrids between Citrus and seven related genera produced by somatic hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 92: 577–582.
- [16] Hagimori M., Nagaoka M., Kato N., Yoshikawa H. 1992. Production and characterization of somatic hybrids between the Japanese radish and cauliflower. *Theor. Appl. Genet.* 84: 819–824.
- [17] Hall R.D., Krens F., Rouwendal G.J.A. 1992. DNA radiation damage and asymmetric somatic hybridization: Is UV potential substitute or supplement to ionising radiation in fusion experiments? *Physiol. Plant.* 85: 319–324.
- [18] Hall R.D., Pedersen Ch., Krens F.A. Progress towards the development of general somatic hybridization protocol for Beta. *J. Sugar Beet Res.* 30: 275–290.
- [19] Hansen L.D., Earle E.D. 1995. Transfer of resistance to *Xanthomonas campestris* pv *campestris* into *Brassica oleracea* L. by protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 91: 1293–1300.
- [20] Kirti P.B., Mohapatra T., Baldev A., Prakash S., Chopra V.L. 1995. A stable cytoplasmic male-sterile line of *Brassica juncea* carrying restructured organelle genomes from the somatic hybrid *Trachystoma ballii* + *B. juncea*. *Plant Breed.* 114: 434–438.
- [21] Krens F.A., Jamar D., Rouwendal G.J.A., Hall R.D. 1990. Transfer of cytoplasm from new Beta CMS sources to sugar beet by asymmetric fusion. 1. Shoot regeneration from mesophyll protoplasts and characterization of regenerated plants. *Theor. Appl. Genet.* 79: 390–396.
- [22] Łojkowska E. 1994. Zastosowanie fuzji protoplastów i selekcji genotypów na poziomie kultur in vitro w hodowli roślin odpornych na patogeny bakteryjne. VII Ogólnopolska Konferencja Kultur in vitro: 15 (streszczenie).
- [23] Mackiewicz H., Rusinowski Z., Malepszy S. 1994. Powstawanie tetraploidów ogórka (*Cucumis sativus*) in vitro. VII Ogólnopolska Konferencja Kultur in vitro: 72 (streszczenie).
- [24] Malepszy S. 1994. Ocena przydatności technik kultury in vitro do uzyskiwania zmienności mutacyjnej na przykładzie ogórka (*Cucumis sativus* L.). VII Ogólnopolska Konferencja Kultur in vitro: 18 (streszczenie).
- [25] Maheshwari S.C., Gill R., Maheshwari N., Gharyal P.K. 1986. Isolation and regeneration of protoplasts from higher plants. W: Differentiation of protoplasts and of transformed plant cells (red. Reinert J. i Binding H.), Berlin Heidelberg New York Tokyo: 3–36.
- [26] Mattheij W.M., Puite K.J. 1992. Tetraploid potato hybrids through protoplasts fusions and analysis of their performance in the field. *Theor. Appl. Genet.* 83: 807–812.
- [27] Melchers G., Sacristan M.D., Holder A.A. 1978. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res. Commun.* 43: 203–218.
- [28] Melchers G., Mohri Y., Watanabe K., Wakabayashi S., Harada K. 1992. One-step generation of cytoplasmic male sterility by fusion of mitochondrial-inactivated tomato protoplasts with nuclear-inactivated *Solanum* protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 6832–6836.
- [29] Menke U., Schilde-Rentschler L., Ruoss B., Zanke C., Hemleben V., Ninnemann H. 1996. Somatic hybrids between the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. and the 1 EBN wild species *Solanum pinnatisectum* Dun.: morphological and molecular characterization. *Theor. Appl. Genet.* 92: 617–626.
- [30] Millam S., Payne L.A., Mackay G.R. 1995. The integration of protoplast fusion-derived material into potato breeding programme – a review of progress and problems. *Euphytica* 85: 451–455.
- [31] Nakano M., Mii M. 1993. Somatic hybridization between *Dianthus chinensis* and *D. barbatus* through protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 86: 1–5.
- [32] Nakano M., Hoshino Y., Mii M. 1996. Intergeneric somatic hybrid plantlets between *Dianthus barbatus* and *Gypsophila paniculata* obtained by electrofusion. *Theor. Appl. Genet.* 92: 170–172.
- [33] Narasimhulu S.B., Kirti P.B., Prakash S., Chopra V.L. 1992. Resynthesis of *Brassica carinata* by protoplast fusion and recovery of novel cytoplasmic hybrid. *Plant Cell Rep.* 11: 428–432.

- [34] Ochatt S.J., Patat-Ochatt E.M. 1995. Protoplast technology for the breeding of top-fruit trees (*Prunus*, *Pyrus*, *Malus*, *Rubus*) and woody ornamentals. *Euphytica* 85: 287–294.
- [35] Pinto F.M., Chupeau Y., Cabrera V.M. 1995. Molecular genetic characterization of plant somatic hybrids. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 31: 96–100.
- [36] Płader W., Burza W., Narkiewicz M. 1994. Tworzenie mieszańców somatycznych ogórka (*Cucumis sativus* L.) z dzikimi gatunkami z rodzaju *Cucumis*. VII Ogólnopolska Konferencja Kultur in vitro: 74 (streszczenie).
- [37] Puite K.J. 1992. Progress in plant protoplast research. *Physiol. Plant.* 85: 403–410.
- [38] Puite K.J., Schaart J.G. 1993. Nuclear genomic composition of asymmetric fusion products between irradiated transgenic *Solanum brevidens* and *S. tuberosum*: limited elimination of donor chromosomes and polyploidization of the recipient genome. *Theor. Appl. Genet.* 86: 237–244.
- [39] Roest S., Gilissen L.J.W. 1989. Plant regeneration from protoplasts: a literature review. *Acta Bot. Neerl.* 38: 1–23.
- [40] Sakai T., Imamura J. 1990. Intergeneric transfer of cytoplasmic male sterility between *Raphanus sativus* (cms line) and *Brassica napus* through cytoplasm-protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 80: 421–427.
- [41] Songstad D.D., Somers D.A., Griesbach R.J. 1995. Advances in alternative delivery techniques. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 40: 1–15.
- [42] Spangenberg G., Wang Z.Y., Legris G., Montavon P., Takamizo T., Perez-Vicente R. 1995. Intergeneric symmetric and asymmetric somatic hybridization in *Festuca* and *Lolium*. *Euphytica* 85: 235–245.
- [43] Stadler M., Stelzer T., Borisjuk N., Zanke C., Schilde-Rentschler L., Hemleben. 1995. Distribution of novel and known repeated elements of *Solanum* and application for the identification of somatic hybrids among *Solanum* species. *Theor. Appl. Genet.* 91: 1271–1278.
- [44] Sundberg E., Glimelius K. 1991. Production of cybrid plants within Brassicaceae by fusing protoplasts and plasmolytically induced cytoplasts. *Plant Sci.* 79: 205–216.
- [45] Taguchi T., Sakamoto K., Terada M. 1993. Fertile somatic hybrids between *Petunia hybrida* and wild species, *Petunia variabilis*. *Theor. Appl. Genet.* 87: 75–80.
- [46] Takebe I., Labib G., Melchers G. 1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften* 58: 318–320.
- [47] Vasil V., Redway F., Vasil I.K. 1990. Regeneration of plants from embryogenic suspension culture protoplasts of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Bio/Technology* 8: 429–434.
- [48] Waara S., Glimelius K. 1995. The potential of somatic hybridization in crop breeding. *Euphytica* 85: 217–233.
- [49] Walters T.W., Mutschler M., Earle E.D. 1992. Protoplast fusion-derived *Ogura* male sterile cauliflower with cold tolerance. *Plant Cell Rep.* 10: 624–628.
- [50] Wang G., Binding H. 1994. A *Solanum* (+) *Potentilla* interfamily protoplast regenerant with *Solanum* characteristics but with a *Potentilla* plastome fraction. *Physiol. Plant.* 91: 155–160.
- [51] Winkelmann T., Grunewaldt J. 1995. Analysis of protoplast-derived plant of *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. *Plant Breed.* 114: 346–350.
- [52] Wolters A., Jacobsen E., O'Connell M., Bonnema G. 1994. Somatic hybridization as a tool for tomato breeding. *Euphytica* 79: 265–277.
- [53] Xu Y.S., Murto M., Dunckley R., Jones M.G.K., Pehu E. 1993. Production of asymmetric hybrids between *Solanum tuberosum* and irradiated *S. brevidens*. *Theor. Appl. Genet.*: 729–734.
- [54] Xu Y.S., Pehu E. 1994. Analysis of chloroplast and mitochondrial DNA in asymmetric somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and irradiated *S. brevidens*. *Trans. Res.* 3: 256–259.
- [55] Yang Z.Q., Shikanai T., Yamada Y. 1988. Asymmetric hybridization between cytoplasmic male-sterile (CMS) and fertile rice (*Oryza sativa* L.) protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* 76: 801–808.

Application of protoplast technique in plant breeding: achievements, problems and perspectives

Summary

The recent progress in techniques related to the culture and fusion of plant protoplasts has permitted to perform genetic modifications of numerous crops. Both inter- and intraspecific somatic hybridization have led to the production of many hybrids which display higher ploidy level and more valuable agricultural traits than donor plants. Asymmetric hybridization, which permits to combine only part of the parent genomes, has enabled the introduction of some desirable traits from wild species into cultivated varieties, e.g. new sources of cytoplasmic male sterility and resistance to pathogens or low temperatures. The spectacular achievements in this field involve the species from the *Solanaceae*, *Gramineae*, *Cruciferaea* and *Citrus* families.

On the other hand, the culture and fusion of protoplasts have caused some problems which are difficult to overcome. They are related to the appearance of albinotic or dwarf plants, formation of sterile hybrids or genetically instable ones, and also production of hybrids displaying undesirable agricultural characteristics.