

FUZJA PROTOPLASTÓW ROŚLINNYCH I JEJ PRAKTYCZNE ZNACZENIE

The plant protoplasts fusion and its practical significance

Ireneusz ŚLESAK

Summary. The article reviews methods used for the isolation and fusion of plant protoplasts. Protoplasts can be released from the cell wall either mechanically or enzymatically. The mechanical approach involves cutting a plasmolyzed tissue in which the protoplasts have shrunk and have been pulled away from the cell wall. In enzymatic methods, the cell wall is digested by special enzyme mixtures containing cellulases, pectinases and hemicellulases. After isolation, protoplasts may be induced to fuse in the presence of chemical fusogens (e. g. polyethylene glycol – PEG) or by electric field (electrofusion). Protoplasts containing nonidentical nuclei are referred to as heterokaryocytes. The fusion of genetically identical protoplasts results in homokaryocytes. If one nucleus completely disappears, the cytoplasm of the two parental protoplasts are still hybridized, and the fusion product is known as a cybrid (cytoplasmic hybrid). Somatic hybrids can be selected by using the following methods: 1) complementation selection of mutants, 2) fluorescent methods (e. g. fluorescence-activated cell sorters (FACS)), 3) isoenzyme analysis, 4) nuclear DNA analysis, 5) chloroplast and mitochondrial DNA analysis, 6) cytological changes in hybrids. In many cases, somatic hybrids that cannot be produced by conventional plant genetics because of sexual or physical incompatibility can be formed only by somatic cell fusion. Agriculturally useful characters (e. g. pathogen resistance) can be selected by somatic hybridization.

Key words: protoplasts, protoplast fusion, somatic hybridization.

Mgr Ireneusz Ślesak, Zakład Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego, Polska Akademia Nauk, ul. Sławkowska 17, 31–016 Kraków.

Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, Instytut Biologii Molekularnej, im. Jana Zurzyckiego, Uniwersytet Jagielloński Al. Mickiewicza 3, 31–120 Kraków.

Obecnie coraz częściej udoskonala się różne gatunki roślin uprawnych w celu zwiększenia ich produktywności, zawartości biologicznie czynnych substancji, czy wyhodowania gatunków oporniejszych na różnego rodzaju czynniki natury biotycznej – zakażenia grzybicze, bakteryjne, wirusowe oraz na czynniki fizyczne i chemiczne np. niską czy wysoką temperaturę, zasolenie gleby, herbicydy, metale ciężkie, zanieczyszczenia atmosferyczne.

Manipulacje z wykorzystaniem protoplastów roślinnych okazały się wygodnymi technikami, alternatywnymi względem metod hodowlanych genetyki klasycznej, pozwalającymi na uzyskiwanie roślin o nowych pożytecznych cechach.

Termin protoplast został wprowadzony do literatury w 1880 roku przez Hansteina [wg 55] i tą nazwą określa się komórkę roślinną pozbawioną ściany komórkowej. Innymi słowy, w skład protoplastu wchodzi wszystkie struktury komórkowe z wyłączeniem ściany komórkowej.

Znaczny postęp w badaniach nad protoplastami notuje się od początku lat 60. naszego stulecia: w 1960 roku Cocking wyizolował protoplasty na drodze enzymatycznego trawienia ściany komórkowej [8]. Proces izolacji protoplastów jest silnie stresogenny. Komórki tracą tzw. informację pozycyjną (ang. positional information) na skutek przzerwiania ciągłości połączeń międzykomórkowych poprzez plazmodes-

Tabela 1. Wybrane metody wprowadzania obcego DNA do materiału roślinnego (z wyjątkiem fuzji somatycznej protoplastów).

Table 1. Selected methods of the foreign DNA transfer into the plant material (with the exception of protoplast somatic hybridization).

Metoda wprowadzania obcego DNA <i>Method of the foreign DNA transfer</i>	Gatunek rośliny/grupa roślin <i>Species/group of plants</i>	Autorzy <i>Authors</i>
transformacja* protoplastów lub dysków liściowych przez plazmid Ti z <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>transformation of protoplasts or leaf discs by Ti plasmid from Agrobacterium tumefaciens;</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> dwuliścienne (<i>Dicotyledones</i>)	Marton et al. 1979 [44] Horsch et al. 1985 [36]
elektroporacja zawiesiny protoplastów <i>electroporation of protoplast suspension</i>	<i>Zea mays</i> <i>Lactuca sativa</i>	Zhang i Wu 1988 [84] Chupeau et al. 1989 [7]
makroinjekcja plazmidu z genem oporności na kanamycynę <i>macroinjection of a plasmid with the kanamycin resistance gene</i>	<i>Secale cereale</i>	de la Pena et al. 1987 [wg 42]
mikroiniekcja plazmidu Ti <i>microinjection of Ti plasmid</i>	<i>Medicago sativa</i>	Reich et al. 1986 [59]
„bombardowanie” komórek „biorców” mikropociskami (np. złota) opłaszczonymi DNA <i>„bombardment” of „acceptor” cells by microprojectiles (e.g. gold) coated by DNA</i>	<i>Allium cepa</i> <i>Glycine max</i>	Klein et al. 1987 [37] Mc Cabe et al. 1988 [46]

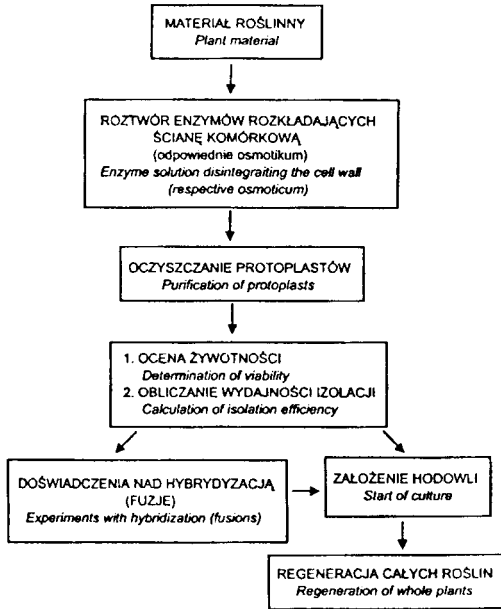
* przeniesienie i inkorporacja obcego DNA z organizmu „dawcy” do organizmu „biocy”.

my. Odmierna jest powierzchnia i objętość komórki, a tym samym zmienia się dostępność substancji odżywczych oraz struktura cytoskieletu [42]. Na temat samych protoplastów, jak również technik ich otrzymywania i hodowli ukazało się dotychczas wiele opracowań, zarówno w piśmiennictwie krajowym [3, 49, 55] jak i zagranicznym [8, 12, 42, 62, 67]. Jednym z najpowszechniejszych praktycznych zastosowań protoplastów stała się tzw. hybrydyzacja somatyczna, polegająca na łączeniu (fuzji) komórek różnych gatunków roślin, prowadząca do otrzymania mieszańców (hybryd somatycznych), które łączą w sobie cechy organizmów wyjściowych. Technika ta jest pozapłciową drogą krzyżowania, czasami odległych taksonomicznie gatunków. Ze względu na pochodzenie fuzjowanych protoplastów, można wyróżnić tzw. mieszańce międzygatunkowe (ang. interspecific hybrids) lub mieszańce międzyrodzajowe (ang.

intergeneric hybrids). W tym drugim przypadku szczególna zaleta metody polega na możliwości krzyżowania roślin, których uzyskanie na drodze płciowej byłoby niemożliwe [9, 53]. W artykule niniejszym przedstawiono techniki izolacji i fuzji protoplastów, a także biotechnologiczne znaczenie hybrydyzacji somatycznej.

PREPARATYKA PROTOPLASTÓW

Ściana komórkowa stanowi istotną przeszkodę we wprowadzaniu do wnętrza żywej komórki roślinnej wielkocząsteczkowych związków chemicznych. Uniemożliwia także swobodne przenoszenie własnego lub obcego materiału genetycznego z jednej komórki do drugiej. Bez pokonania tej bariery uzyskiwanie roślin transgenicznych o nowych cechach jest znacznie utrudnione. Sytuacja zmienia się z chwilą, gdy komórkę sztucznie pozbawimy ściany ko-



Ryc. 1. Uproszczony schemat postępowania przy hybrydyzacji somatycznej *in vitro* z zastosowaniem protoplastów.

Fig. 1. A simplified scheme of procedure somatic hybridization of protoplasts *in vitro*.

mórkowej. Wówczas wprowadzanie obcych genów staje się znacznie prostsze. Dzięki temu zabiegowi można było zastosować technikę elektroporacji i uzyskiwać transgeniczne gatunki np. *Brassica napus* [30], *Lactuca sativa* [7], *Oryza sativa* [68], czy *Zea mays* [60]. Stosowano także transformację protoplastów plazmidem Ti *Agrobacterium tumefaciens* [44]. Wybrane metody wprowadzania obcego DNA zebrano w tabeli 1. Usunięcie ściany komórkowej jest również warunkiem, który decyduje o powodzeniu dalszych eksperymentów nad fuzją protoplastów.

W metodyce uzyskiwania protoplastów wyróżnia się kilka etapów, a dokładne przepisy i porady praktyczne można znaleźć w opracowaniach, które cytowano we wstępie.

Materiałem wyjściowym (ryc. 1), z którego otrzymuje się protoplasty mogą być zarówno hodowle tkanek *in vitro* – przeważnie kalus oraz komórki z hodowli zawiesinowych (ang. suspension cell culture) [29, 42, 58]. Mogą być nim również tkanki z organów roślinnych oraz

wyspecjalizowane grupy komórek, jak: korzenie, pędy, fragmenty kwiatu, ziarna pyłku, aparaty szparkowe. Najpowszechniejszym źródłem protoplastów jest mezofil liści [14, 35, 47]. Gdy celem izolacji jest założenie kultury sterylnej oraz doświadczenia nad fuzją protoplastów, najlepiej wykorzystywać liście z młodych roślin jeszcze przed okresem kwitnienia. Gwarantuje to dużą aktywność podziałową wyizolowanych protoplastów [20].

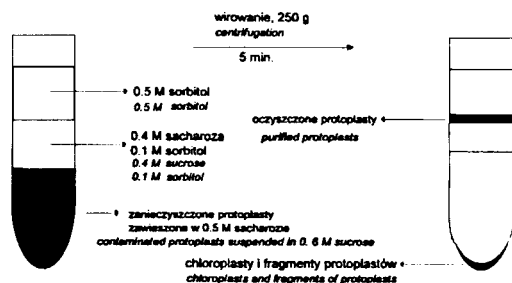
Jeśli materiałem wyjściowym jest organ lub tkanka z hodowli *in vitro* nie ma konieczności sterylizacji materiału przed izolacją protoplastów. Inaczej rzecz się ma z roślinami hodowanymi w warunkach quasi-naturalnych. Wtedy wymagane jest uprzednie staranne wysterylizowanie materiału przed przystąpieniem do izolacji protoplastów [20]. Najpowszechniej używanym środkiem dezynfekującym jest podchloryn sodu lub jego handlowe ekwiwalenty, np. Clorox, Domestos itp. Przeważnie do roztworu dezynfekującego dodaje się detergent np. Tween 80, który polepsza warunki sterylizacji. Optymalne stężenia substancji dezynfekującej dobiera się eksperymentalnie, w zależności od rodzaju tkanki. Chodzi o dobranie takich warunków, aby tkanka poddana działaniu toksycznego dla komórek środka dezynfekującego nie uległa całkowitemu obumarciu, przy jednoczesnym zachowaniu zdolności podziałowej komórek.

Kolejnym etapem postępowania jest eliminacja ścian komórkowych. Mogą być one usuwane mechanicznie lub na drodze trawienia enzymatycznego. Izolacja mechaniczna polega na preplazmolizie komórek w roztworze hipertonicznym wybranego osmoprotektanta (patrz niżej), a następnie na rozdrobnieniu (np. w homogenizatorze) tkanki [72]. W rezultacie splazmolizowane komórki (protoplasty) opuszczają uszkodzoną tkankę i mogą być wykorzystywane w dalszych etapach omawianej procedury. Metody mechaniczne stosowane są nieco rzadziej, choć dla specyficznego materiału roślinnego (np. kukurydza) charakteryzują się porównywalną wydajnością jak techniki z zastosowaniem enzymów [72]. W metodach enzymatycznych stosuje się enzymy z grupy celulaz, hemicelulaz i pektynaz, otrzymywanych z grzy-

bów *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* i *Rhizopus.sp* [8, 67]. Metody enzymatyczne są obecnie powszechnie stosowane. Do ich podstawowych zalet należą: 1) wysoka wydajność izolacji, 2) uszkodzenie znacznie mniejszej liczby komórek niż w metodach mechanicznych [2]. Proces hydrolizy ściany przeprowadza się w eksperymentalnie ustalonych warunkach: stężenie enzymów przeważnie 0,2–3 %, czas inkubacji rzędu kilku do kilkunastu godzin, całkowita ciemność, względnie słabe światło rozproszone; optymalna temperatura w zakresie 23–30°C, pH 5,5–5,8. Firmowe preparaty enzymów rozkładających ścianę komórkową są przeważnie w mniejszym lub większym stopniu zanieczyszczone innymi enzymami m. in. proteinazami, które mogą uszkadzać białka plazmolemowe podczas izolacji protoplastów. Dlatego do mieszanin trawiących dodaje się związki osłonowe, takie jak albumina wołowa (BSA – ang. bovine serum albumin), DTT (ditiotretitol) lub inhibitory proteinaz np. PMSF (fenylo-metylo-sulfonylofluorek) [21]. Bardzo istotne jest zapewnienie izosmotyczności roztworu izolacyjnego względem wnętrza protoplastu. Zadanie to spełniają stabilizatory osmotyczne (osmoprotektanty) takie jak: sacharoza, sorbitol i mannitol (zakres stosowanych stężeń od 0,4 do 0,8 M). Alkoholowe pochodne cukrów, sorbitol i mannitol, w bardzo niewielkim stopniu wnikają do wnętrza protoplastów i są praktycznie metabolicznie nieaktywne i dlatego często się je stosuje [43]. Jako dodatkowego czynnika stabilizującego protoplasty używa się związków zawierających jony Ca^{2+} lub Mg^{2+} (stężenia: 1–2 mM) [41, 62, 67].

OCZYSZCZANIE

Zawiesina uzyskana po trawieniu enzymami zawiera oprócz nieuszkodzonych protoplastów, również niestrawione fragmenty tkanki, uszkodzone protoplasty, oraz fragmenty komórek. W celu pozbycia się enzymów i zanieczyszczeń stosuje się różnorodne metody oczyszczania pierwotnej zawiesiny protoplastów. Najprostsze polegają na kilkakrotnym przemywaniu świeżej zawiesiny, buforem o pH powyżej optimum aktywności enzymów rozkładających ścianę ko-



Ryc. 2. Przykładowy gradient stęgowy do czyszczenia protoplastów [wg 41, zmienione].

Fig. 2. A gradient for purification of protoplasts [after 41, modified].

mórkową, połączonym z odwirowywaniem protoplastów lub rozdzielaniem za pomocą siatek o odpowiednio dobranej wielkości „oczek” [41]. Ostatnio coraz częściej stosuje się metody wirowania w gradientach gęstości ciągłych (percoll, ficoll) lub skokowych (np. sacharoza + sorbitol). W metodach tych wykorzystuje się różnice we flotacji pomiędzy całymi protoplastami a zanieczyszczeniami (ryc. 2) [3, 41, 67].

OCENA ŻYWOTNOŚCI

Nieuszkodzone protoplasty przyjmują kształt kulisty wskutek działania sił napięcia powierzchniowego. Bardzo ważna jest ocena żywotności (ang. viability) uzyskanego materiału. Powszechnie stosowanymi „szybkimi” wskaźnikami żywotności są barwniki, wnikające do nieuszkodzonych komórek np. czerwień obojętna, która gromadzi się w wakuolach żywych protoplastów, natomiast w martwych protoplastach nie obserwuje się jej akumulacji. Inne barwniki: błękit trypanu, błękit Evansa, czy feno-safranina penetrują tylko do wnętrza martwych komórek [6, 12]. Innym powszechnie stosowanym wskaźnikiem jest diocyan fluoresceiny (FDA). FDA wnika do wnętrza protoplastu, a esterazy cytoplazmatyczne uwalniają, w żywych komórkach na drodze hydrolytycznej fluoresceinę, która po wzbudzeniu światłem niebiesko-fioletowym emituje zielonożółte światło fluorescencyjne [6]. W ocenie żywotności zastosowanie znalazł także kalkofluor (ang. calco-

fluor white (CW)) – wskaźnik fluorescencyjny, wiążący się specyficznie z mikrofibrylami celulozowymi na powierzchni protoplastu. Kalkofluor daje obraz niebieskawo-żółtego pierścienia wokół protoplastu, który resyntetyzuje ścianę komórkową [6,16]. Metoda ta jest na tyle czuła, że już po kilku godzinach od momentu wyizolowania protoplastów, można zaobserwować wyraźną reakcję CW z celulozą [4]. Użytecznymi wskaźnikami żywotności mogą być także parametry fizjologiczne, takie jak aktywność fotosyntetyczna lub oddechowa [6]. Na podstawie oceny żywotności określa się wydajność izolacji jako liczbę nieuszkodzonych protoplastów przeliczoną na jednostkę świeżej masy tkanki [3].

Z hodowlanego punktu widzenia najistotniejszym wyznacznikiem witalności protoplastów jest przełamanie latencji podziałowej i odzyskanie zdolności do regeneracji całej rośliny lub jej organów. Uzyskanie zdolności podziałowej przez pojedyncze protoplasty, jak również otrzymane na drodze fuzji hybrydy somatyczne, jest punktem krytycznym dla wyhodowania nowych, dojrziałych roślin [16, 27].

FUZJA

NATURALNA FUZJA PROTOPLASTÓW

W warunkach naturalnych fuzja zachodzi podczas tworzenia się zygoty, gdy łączą się gamety w odpowiednim momencie cyklu płciowego rośliny [4]. Ponadto protoplasty roślin wyższych w obrębie jednego organizmu tworzą tzw. symplast, podobnie jak continuum celulozowe ściany komórkowej buduje apoplast. Ciągłość symplastu zapewniają plazmodesmy, które powstają w rezultacie cytokinezy i tworzą się w obrębie tkanek podczas rozwoju rośliny. Zatem protoplasty poszczególnych komórek pozostają w organizmie roślinnym jak gdyby w stanie permanentnej, ograniczonej fuzji na poziomie plazmodesmalnym [4]. Fuzja zachodzi także podczas powstawania tzw. heteroplazmatycznych plazmodesm, które tworzą się pomiędzy komórkami pasożytniczych grzybów, a komórkami rośliny-gospodarza [4, 38].

Z zasygnalizowanych powyżej przykładów wynika, że zjawisko fuzji międzykomórkowej w świecie roślin nie jest niczym nadzwyczajnym. Nawet w populacji świeżo wyizolowanych protoplastów może dochodzić do ich spontanicznego łączenia się, choć wydajność spontanicznej fuzji jest bardzo niska. Przyczyną tego jest obecność ujemnego ładunku elektrycznego na powierzchni protoplastu. Ładunek ten sprawia, że protoplasty wykazują raczej tendencję do odpychania się, niż łączenia. Pokonanie sił elektrostatycznego odpychania pozwala indukować proces fuzji w warunkach eksperymentalnych.

EKSPERYMENTALNE METODY FUZJOWANIA PROTOPLASTÓW

Istotną rzeczą, na którą należy zwrócić uwagę jeszcze przed rozpoczęciem fuzji, jest stopień oczyszczenia materiału. Zawiesina protoplastów powinna zawierać możliwie niewielkie ilości wszelkich niepożądanych elementów, takich jak uszkodzone protoplasty, fragmenty komórek itp., które mogą wchodzić w interakcję z protoplastami „zdrowymi” i tym samym zaburzać prawidłowość całego procesu fuzji. Drugi niezwykle ważny czynnik stanowi czas jaki upłynął pomiędzy wyizolowaniem i oczyszczeniem protoplastów, a właściwą fuzją [4]. Związane jest to z bardzo szybką resyntezą mikrofibryl celulozowych ścian komórkowej, które utrudniają łączenie się protoplastów. Na przykład drastyczny spadek wydajności fuzji stwierdzono już po 15 min. od momentu strawienia ściany komórkowej. Po dwóch godzinach liczba łączących się protoplastów spadała z 9 % (po 5 min. od wyizolowania czystych protoplastów) do 1 % [80]. Wydajność fuzji (ang. fusion frequency, FF) określa zależność [wg 3]:

$$FF = \frac{\text{liczba zfuzyjowanych protoplastów} \times 100}{\text{całkowita liczba wprowadzonych protoplastów}}$$

Łączenie ułatwiają substancje zwane stymulatorami fuzji tzw. fuzogeny (Tab. 2.). Najczęściej w tym celu używa się glikolu polietylenowego (PEG) [10, 47, 73] lub przeprowadza się elektrofuzję (szok elektryczny) [32, 58, 69, 85].

FUZJA INDUKOWANA CHEMICZNIE

Działanie stymulatorów takich jak PEG, który jest słabym, niejonowym środkiem powierzchniowo czynnym (surfaktantem), polega na usuwaniu lub zmniejszaniu sił odpychania między protoplastami poprzez neutralizację ujemnego ładunku powierzchniowego plazmolemy [4]. W efekcie neutralizacji, protoplasty mogą się wzajemnie zlepiać (aglutynować), a następnie dochodzi do wytworzenia integralnych połączeń pomiędzy błonami zaglutynowanych protoplastów. Warto wspomnieć, że PEG stosowano jako czynnik ułatwiający bezpośrednie wprowadzanie obcego DNA do protoplastów [39]. Szerokie zastosowanie znajduje także sekwencyjne dodawanie różnych fuzogenów (Tab. 2). Przykładowo: na początku protoplasty inkubuje się kilka minut w obecności PEG, a następnie PEG wypłukuje się buforem o wysokim pH (9–11), z dużą zawartością jonów Ca^{2+} (10–50 mM). W rezultacie możemy uzyskać wydajność fuzji w zakresie od 1–10 % [42].

Tabela 2. Fuzogeny chemiczne.

Table 2. Chemical fusogens.

glikol polietylenowy (PEG) <i>polyethyleneglycol (PEG)</i>
PEG + wysokie pH i Ca^{2+} <i>PEG + high pH and Ca^{2+}</i>
PEG + DMSO (dimetylosulfotlenek) <i>PEG + DMSO (dimethyl sulfoxide)</i>
wysokie pH (9–11) i stężenie Ca^{2+} (10–50 mM) <i>high pH (9–11) and Ca^{2+} concentration (10–50 mM)</i>
alkohol poliwinylowy <i>polyvinyl alcohol</i>
siarczan dekstranu <i>dextran sulphate</i>
związki polikationowe, np. poli-L-lizyna <i>plycations, e.g. poly-L-lysine</i>
roztwory soli, np. KNO_3 , NaNO_3 <i>salt solutions, e.g. KNO_3, NaNO_3</i>

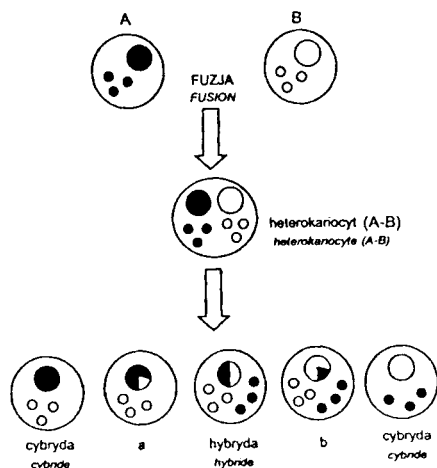
ELEKTORFUZJA

Elektrofuzja ma miejsce po zastosowaniu pola pulsującego o wysokim napięciu (rzędu $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$) i krótkim (rzędu μs) okresie trwania [76]. Na początku protoplasty są umieszczane w środowisku o niskiej oporności. Pomędzy elektrodami wytwarza się zmienne pole elektryczne o wysokiej częstotliwości (0.5–1.5 MHz). Dzięki procesowi tzw. dialektroforezy dochodzi do polaryzacji ładunku powierzchniowego protoplastów. Spolaryzowane komórki zachowują się jak dipole i migrują do obszarów o największym natężeniu pola elektrycznego. Podczas wędrówki protoplasty ustawiają się wzdłuż linii pola, a jednocześnie stykają się wzajemnie i formują łańcuchy (ang. „pearl chains”). Ich długość zależy m. in. od gęstości protoplastów, natężenia pola elektrycznego oraz czasu jaki upłynął od momentu włączenia prądu. W drugim etapie protoplasty poddaje się działaniu krótkich (10–200 μs) impulsów prądowych (1–3 kVcm^{-1}). W wyniku takiego traktowania dochodzi do odwracalnej perforacji błony komórkowej, co prowadzi do fuzjowania błon stykających się ze sobą protoplastów [42]. Jedną z korzyści jakie daje elektrofuzja, w porównaniu do fuzji indukowanej chemicznie jest precyzyjniejsza kontrola parametrów (np. wielkości i czasu trwania impulsów prądowych), które mogą decydować o wydajności fuzji [42]. Wydajność elektrofuzji zależy od źródła protoplastów. Na przykład protoplasty wyizolowane z mezofilu liścia *Solanum brevidens* fuzjowały między sobą 2-krotnie efektywniej, niż protoplasty o identycznym genotypie (z tej samej rośliny) otrzymane z hodowli zawieszinowej [74]. O wydajności fuzji decyduje także środowisko w jakim protoplasty wcześniej przebywały. Ilość fuzjujących protoplastów z hodowli zawieszinowej *Solanum brevidens* rośnie, jeśli protoplasty oprócz standardowego mannitolu (0.5 M) potraktuje się wcześniej sperminą (jedną z naturalnych poliamin) lub elektrofuzję przeprowadza się w obecności 1 mM CaCl_2 [75]. Modyfikacją elektrofuzji jest łączenie protoplastów techniką elektroakustyczną, gdzie impulsy elektryczne w połączeniu z ultradźwiękami wyraźnie zwiększają ilość fuzjowanych komórek [81].

FORMY MIESZAŃCOWE

W wyniku fuzji dochodzi do połączenia się cytoplazmy dwóch oddzielnych protoplastów. Wówczas może dojść do zlania się jąder fuzjujących komórek, przy czym fuzji mogą ulegać więcej niż dwa protoplasty. Ponadto, zarówno podczas izolacji oraz procesu fuzjowania protoplastów, mogą powstawać tzw. subprotoplasty, zawierające: 1) jądro komórkowe (tzw. miniprotoplasty), 2) plastydy, 3) mitochondria. Dwa ostatnie rodzaje subprotoplastów często określa się jako cytoplasty [4, 42]. Podstawowym zadaniem fuzji jest „zmieszanie” dwóch odmiennych „programów genetycznych” zawartych w genomie jądrowym (nDNA). Jeżeli geny cytoplazmatyczne (tzw. geny plazmonu): DNA mitochondrialne (mtDNA) i DNA plastydowe (głównie chloroplastowe, cpDNA) nie są zróżnicowane u form rodzicielskich, to w wyniku fuzji otrzymujemy homoplazmatyczny heterokariocyt. Formy mieszańcowe, które nie różnią się informacją genetyczną zawartą w jądrze komórkowym, natomiast różnią się genami zawartymi w plazmone, określane są jako heteroplazmatyczne homokariocyty [53]. W przypadku genomu jądrowego po fuzji można otrzymać tzw. mieszańce symetryczne z pełną zawartością genomów obojga rodziców lub mieszańce niesymetryczne, gdzie każdy z wyjściowych protoplastów wnosi nierównomierny udział genetyczny w układ mieszańcowy [3, 27]. Potomstwo mieszańców niesymetrycznych oprócz niepełnego genomu jądrowego jednego z rodziców (obecność pojedynczych chromosomów lub ich fragmentów), posiada również geny plastomu. Geny te segregują niezależnie od genomu jądrowego i w rezultacie fuzji powstają rozmaite układy mtDNA i cpDNA. W końcu może dojść do sytuacji, gdzie jądrowy materiał genetyczny jednego gatunku ulegnie całkowitej degeneracji. Takie formy mieszańcowe określa się mianem cybryd (ang. cybrids) [27, 53, 42]. Wszystkie możliwe warianty sumarycznie zestawia ryc. 3.

Dotychczas niewiele wiadomo na temat natury czynników decydujących o tym, czy fuzja jądrowego materiału genetycznego w ogóle zajdzie i jak będzie wyglądała ostateczna segrega-



Ryc. 3. Fuzja dwóch genetycznie różnych protoplastów; a i b: hybrydy asymetryczne [wg 42, zmodyfikowane].

Fig. 3. Fusion of two genetically-different protoplasts; a and b: asymmetrical hybrids [after 42, modified].

cja i rozmieszczenie chromosomów rodzicielskich [27]. Niektórzy badacze przypuszczają, że istotnym czynnikiem jest m. in. rozlokowanie chromosomów rodzicielskich w tzw. płytce metafazowej pierwszego podziału mitotycznego formy mieszańcowej [25]. Stopień zachowania wyjściowego genomu w protoplastach po fuzji zależy od gatunków jakie ulegają połączeniu, warunków izolacji i fuzji protoplastów. Zmiany w obrębie genomu protoplastów oraz wyprowadzonych z nich roślin mogą również zachodzić w trakcie hodowli *in vitro* (tzw. zmienność somaklonalna) [27, 50, 57]. Na przykład Schnabelrauch i wsp. (1985) opisali spontaniczne zmiany w stabilności genetycznej pomiędzy różnymi, somatycznymi hybrydami *Petunia parodii* + *P. inflata* [64]. Sihachkr i wsp. (1989) znaleźli różnice w stabilności pomiędzy liniami mieszańcowymi *Solanum melongena* + *S. torvum* [69]. Podobne różnice zaobserwowano w międzygatunkowych krzyżówkach somatycznych ziemniaka [78], w układach międzyrodzajowych *Brassica napus* + *Eruca sativa* [17], *Duboisia hopwoodii* + *Nicotiana tabacum* [15]. Zazwyczaj część form mieszańcowych traci w trakcie różnicowania komórek większość chloroplastów i mitochondriów należących do jednego

z rodziców. Najczęściej dochodzi do tego już po pierwszych podziałach mitotycznych. Podobnie jak w wypadku spontanicznej degeneracji całego lub części genomu jądrowego jednego gatunku, tak i w wypadku genów plastomu nie potrafimy jednoznacznie wytłumaczyć przyczyn prowadzących do powstania określonego układu genetycznego u form mieszańcowych [4]. Jeśli chcemy uzyskać cytologicznie łatwo rozpoznawalne hybrydy komórkowe, to do otrzymywania mieszańców niesymetrycznych, głównie cybryd, często stosuje się technikę naświetlania protoplastów jednego gatunku promieniami X lub γ . W produktach fuzji z protoplastami nienaświetlanymi otrzymujemy wówczas formy o częściowo lub całkowicie zinaktywowanym genomem jądrowym tego gatunku [18, 19, 26, 66, 83].

SELEKCJA MIESZAŃCÓW

W mieszaniu protoplastów dwóch gatunków roślin A i B będzie dochodzić do fuzji: A-A, B-B i A-B. Z teoretycznego i praktycznego punktu widzenia interesujące są tylko hybrydy międzygatunkowe lub międzyrodzajowe typu A-B. W praktyce trzeba stosować rozmaite „markery” hybrydyzacji pozwalające z całej masy zfuzjowanych protoplastów wybrać te właściwe (A-B). Czasami dopiero w hodowli *in vitro* lub nawet w zregenerowanych roślinach można wykryć cechy mieszańcowe [42, 53]. Metody wykrywania hybryd protoplastowych zaraz po fuzji można podzielić na kilka grup, które zostaną omówione poniżej.

SELEKCJA OPARTA O ZJAWISKO KOMPLEMENTACJI

Zasada tej metody opiera się na tym, że protoplasty mutantu A będą rosły tylko na pożywce A', zawierającej czynnik selekcyjny A'. Może to być herbicyd, na który mutant A jest odporny lub substancja odżywcza niezbędna dla wzrostu mutantu A. Mutant B reaguje podobnie na inny czynnik (B'). Protoplasty mutantów po hybrydyzacji (A-B) będą się rozwijać tylko na pożywce zawierającej obydwa czynniki selekcyjne: A' + B' [42]. Metoda ta z powodzeniem służy do wykrywania hybryd somatycznych także na dal-

szych etapach hodowli. Selekcję opartą o zjawisko komplementacji stosuje się dość powszechnie, a najczęściej wykorzystywanymi mutantami są:

1. Mutanty bezchlorofilowe (brak zdolności do syntezy chlorofilu) [13, 22, 24, 65].

2. Mutanty auksotroficzne [33, 34] np. niezdolne do syntezy reduktazy azotanowej [18, 26, 32, 45].

3. Mutanty niewrażliwe na pewne związki chemiczne. Może to być oporność na antybiotyki jednego z wyjściowych gatunków [1] np. na streptomycynę [32, 48], linkomycynę [11], kanamycynę [35], czy herbicydy np. atrazynę [54, 31] lub toksyny grzybicze np. tentoksynę [22].

Częstość występowania produktów fuzji zawierających nowy układ cech jest bardzo zmienna. Kiedy wykorzystuje się selekcję polegającą na komplementacji, wydajność fuzji określa się jako liczbę kolonii z badaną właściwością przypadającą na ogólną liczbę połączonych protoplastów lub podaje się procentowy udział roślin o odmiennym niż rodzice fenotypie w ogólnej liczbie zregenerowanych roślin pierwszego pokolenia [42, 53].

METODY FLUORESCENCYJNE

W metodach fluorescencyjnych korzysta się z cytometrów przepływowych typu FACS (ang. Fluorescence Activated Cell Sorter). Urządzenia te rutynowo wykorzystuje się do sortowania różnych rodzajów komórek zwierzęcych. Dwie populacje komórek, które chcemy rozdzielić znakuje się innymi znacznikami fluorescencyjnymi np. fluoresceiną i rodaminą. Urządzenie indukuje silny strumień odpowiedniego roztworu, w którym znajdują się komórki. Jednocześnie światło laserowe wzbudza fluorescencję barwników. Odmiennie wyznakowane i elektrostatycznie naładowane jednokomórkowe kropelki zawiesiny są odchylane w sterowanym polu elektrostatycznym i automatycznie kierowane do dwóch sterylnych pojemników. W zależności od rodzaju cytometru przepływowego możemy także mierzyć różnice w intensywności fluorescencji wyznakowanych komórek. Formy mieszańcowe charakteryzuje sumaryczna fluorescencja składników wyjściowych. W przypadku

materiału roślinnego naturalnym znacznikiem jest czerwona autofluorescencja chlorofilu. Produkty fuzji protoplastów mezofilu liścia z protoplastami z bezbarwnej linii komórkowej możemy wykryć i rozdzielić dzięki powyższej technice [5, 42]. Żmudną i rzadziej stosowaną metodą jest mikroskopia fluorescencyjna i bezpośrednio wyszukiwanie odpowiednio wyznakowanych hybryd protoplastowych. Wadą metod fluorescencyjnych jest szkodliwość fluorochromów dla komórek, stąd często stosuje się ją tylko we wstępnych doświadczeniach w celu określenia optymalnych warunków fuzji [53].

IZOLACJA MECHANICZNA MIESZAŃCÓW

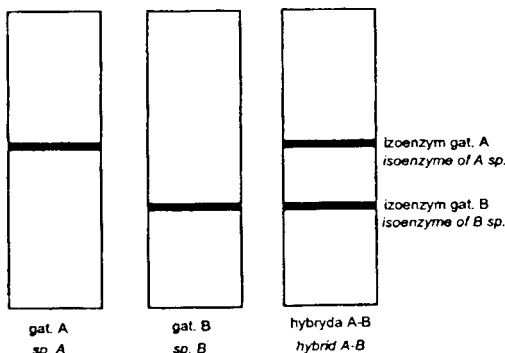
Produkty fuzji można także rozdzielać, korzystając z mikroskopu świetlnego oraz mikropipety połączonej ze strzykawką o odpowiednio dobranym tempie zasysania płynu. W tej metodzie badacz bezpośrednio rozdziela zfusjonowane komórki, kierując się cechami wizualnymi jednego z gatunków. Głównie obecność naturalnych markerów komórkowych, takich jak: chloroplasty, ziarna skrobi, obecność barwników antocyjanowych itp. ułatwia wyszukanie form mieszańcowych (A-B) [4, 42].

CHARAKTERYSTYKA HYBRYD SOMATYCZNYCH

Opisane wcześniej metody odróżniania form mieszańcowych od form rodzicielskich dotyczą najwcześniejszego etapu otrzymywania mieszańców somatycznych, występującego bezpośrednio po zainicjowaniu fuzji protoplastów. W trakcie dalszej hodowli hybrydowych tkanek, po indukcji pędu, czy korzenia, zestaw cech, które mogą służyć do oceny wydajności fuzji znacznie się powiększa.

ANALIZA IZOENZYMOWA

Zasada metody polega na tym, że enzymy danego gatunku charakteryzują się określoną ruchliwością elektroforetyczną w żelu (np. poliakrylamidowym), w zależności od masy cząsteczkowej i ładunku rozdzielanego białka. Jeśli u mieszańca (A-B) dojdzie do ekspresji obu genów odpowiedzialnych za syntezę enzymu,



Ryc. 4. Wykrywanie form hybrydowych poprzez rozdział elektroforetyczny izoenzymów.

Fig. 4. Detection of hybrid forms using electrophoresis of isoenzymes.

katalizującej tą samą reakcją, to na żelu powinniśmy wykryć dwa pasma wskazujące na enzym pochodzący z gat. A i B (Ryc. 4). Najczęściej analizowanymi enzymami są: amylazy, esterazy, peroksydazy, fosfoglukomutazy, aminotransferazy [27, 42, 52]. Czasami dodatkowe pasma białkowe na żelu nie odpowiadają wzorowi izoenzymowemu uzyskanemu dla form rodzicielskich, dlatego niektórzy autorzy uważają, że są to artefakty [40]. Możliwe jest również, że to tzw. „milczące geny” (ang. silent genes) ulegają de-represji w hybrydach somatycznych na skutek zupełnej zmiany środowiska genetycznego [23].

ANALIZA JĄDROWEGO DNA

DNA z organizmów wyjściowych (rodzicielskich) jest izolowane, a następnie cięte przez odpowiednie enzymy restrykcyjne. Następnie fragmenty DNA są rozdzielane elektroforetycznie na żelu. Tak rozdzielone DNA jest przenieszone na odpowiednie membrany (np. nitrocelulozowe). Wcześniej sporządzone i wyznakowane np. izotopami ^{35}S , ^3H sondy DNA, o znanej sekwencji nukleotydów, będą hybrydyzować z komplementarnymi, badanymi (rodzicielskimi) fragmentami DNA. W rezultacie autoradiogramy DNA pochodzącego od mieszańców somatycznych (A-B) powinny charakteryzować się pasmami, które będą zawierały DNA obydwu form rodzicielskich [42].

ANALIZA CHLOROPLASTOWEGO I MITOCHONDRIALNEGO DNA

W przypadku genomu pozajądrowego, DNA po izolacji także poddaje się fragmentacji przez odpowiednie restryktazy. W przypadku chloroplastowego i mitochondrialnego DNA, nie tylko w „świeżo” otrzymanych mieszańcach, ale często także już w trakcie dalszej hodowli tkanek hybrydowych dochodzi spontanicznie do częściowej lub całkowitej utraty jednego z wyjściowych zestawów chloroplastów i mitochondriów, razem z odpowiadającym im zestawem genów [42]. Elektroforeza żelowa otrzymanych fragmentów cpDNA i mtDNA z sondami DNA pozwala oszacować stopień „wymieszania” pozajądrowego materiału genetycznego dla form wyjściowych i mieszańcowych (A-B).

ANALIZA CYTOLOGICZNA

Obserwacje mikroskopowe rozwijających się tkanek hybrydowych pozwalają śledzić zmiany zachodzące zarówno na poziomie genomu jądrowego jak i pozajądrowego [42]. Przede wszystkim, w zależności od zachowania chromosomów rodzicielskich, możemy uzyskiwać formy o różnym stopniu ploidalności. Do analizy zmian w obrębie chromosomów stosuje się rozmaite metody barwienia. Stwierdzenie stopnia wzajemnej inkorporacji jądrowego materiału genetycznego jest najwygodniejsze, jeżeli np. chromosomy gatunków rodzicielskich wyraźnie różnią się rozmiarami i kształtem [4].

PRAKTYCZNE ZNACZENIE HYBRYDYZACJI SOMATYCZNEJ

Hybrydyzacja somatyczna jest, jak dotychczas, jedyną metodą pozwalającą na ominięcie pre- i postzygotycznych barier występujących w procesie seksualnego krzyżowania roślin [5, 27, 53]. Dodatkowo umożliwia ona otrzymywanie mieszańców pomiędzy odległymi gatunkami, a nawet rodzajami roślin, co prowadzi do powstania unikalnych kombinacji cech lub uzyskania cech nowych, wynikających z oddziaływań pomiędzy wyjściowymi genomami [9, 27]. Na

drodze hybrydyzacji somatycznej próbuje się także modyfikować rośliny bezpłodne lub częściowo bezpłodne, które dotychczas rozmnażano tylko na drodze wegetatywnej oraz gatunki o bardzo długim cyklu rozwojowym [5].

Tak zwane mieszańce niesymetryczne, łączące pełny genom jednego i część genomu drugiego gatunku, zarówno na poziomie jądrowym jak i cytoplazmatycznym, mogą znaleźć zastosowanie w genetycznej analizie komórek somatycznych, analogicznie do metod opracowanych dla komórek zwierzęcych [27, 51]. Hybrydyzacja somatyczna, jak już wspomniano wyżej, jest techniką uzyskiwania mieszańców pomiędzy formami bezpłodnymi [27]. Schieder (1978) jako jeden z pierwszych otrzymał płodne mieszańce *Datura innoxia* + *D. discolor* oraz *D. innoxia* + *D. stramonium* przez fuzję protoplastów z mezofilu liścia. Konwencjonalne krzyżowanie na drodze płciowej pomiędzy tymi gatunkami jest niemożliwe. Zregenerowane hybrydy roślinne produkowały o około 20–25 % alkaloidów więcej niż formy rodzicielskie, w tym skopolaminę mającą zastosowanie farmaceutyczne [63]. W wyniku hybrydyzacji somatycznej *Solanum tuberosum*, który jest wrażliwy na wirusa PLRV (ang. potato leaf roll virus) i wirusa typu Y (PVY) z opornym dzikim typem *Solanum brevifolium*, otrzymano niewrażliwe i płodne mieszańce. Również w tym przypadku uzyskanie opornego mieszańca na drodze klasycznej jest niemożliwe [42]. Dzięki połączeniu protoplastów *Brassica napus* + *B. nigra* uzyskano roślinę oporną na pasożytniczego grzyba *Phoma lingam* [70, 71]. Metodę fuzji somatycznej z powodzeniem zastosowano do otrzymywania korzystnych z hodowlanego punktu widzenia roślin z rodzaju *Citrus* [77]. Innym przykładem może być również przeniesienie cech oporności na pestycydy pomiędzy gatunkami tytoniu [9].

PODSUMOWANIE

Otrzymano ponad 60 nowych roślin zregenerowanych z protoplastów na drodze fuzji międzygatunkowej i międzyrodzajowej (wybrane przykłady podaje tabela 3). Wykorzystanie techniki fuzjowania protoplastów w tworzeniu

Tabela 3. Wybrane przykłady przeprowadzonych w ostatnich latach fuzji międzygatunkowych i międzyrodzajowych, które zakończyły się uzyskaniem całych roślin lub pędów.

Table 3. Selected examples of recently performed interspecific and intergeneric fusions, which succeeded in whole plants or shoots regeneration.

Fuzje międzygatunkowe i międzyrodzajowe <i>Interspecific and intergeneric fusions</i>	Autorzy <i>Authors</i>
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> + <i>N. silvestris</i>	Famelaer et al. 1989 [18]
<i>Brassica campestris</i> + <i>B. napus</i>	Rosen et al. 1988 [61]
<i>Solanum tuberosum</i> + <i>S. brevidens</i>	Preszner et al. 1992 [56]
<i>Solanum melongena</i> + <i>S. torvum</i>	Sihachakr et al. 1989 [69]
<i>Petunia hybrida</i> + <i>N. plumbaginifolia</i>	Hinnisdaels et al. 1991 [35]
<i>Severinia disticha</i> + <i>Citrus sinensis</i>	Grosser et al. 1988 [29]
<i>Lycopersicon esculentum</i> + <i>S. tuberosum</i>	Schoenmakers et al. 1993 [65]

materiałów wyjściowych do hodowli jest ograniczone przede wszystkim dlatego, że u wielu gatunków nie udało się zregenerować roślin z protoplastów. Na przykład dużo problemów sprawiają rośliny strączkowe (*Fabaceae*) oraz jednoliścienne (*Monocotyledones*). Dane przedstawione w niniejszym artykule upoważniają do stwierdzenia, że technika fuzjowania protoplastów pozwala na uzyskiwanie nowej zmienności genetycznej takich cech roślin dwuliściennych (*Dicotyledones*) – przede wszystkim należących do rodziny *Solanaceae* – które mogą być wykorzystane przez hodowców roślin [42, 53, 79].

PODZIĘKOWANIA

Chciałbym serdecznie podziękować Panu prof. dr. hab. Stanisławowi Więckowskiemu i Pani doc. dr. hab. Halinie Gabryś (Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin UJ) oraz Panu doc. dr. hab. Zbigniewowi Miszałskiemu (Zakład Fizjologii Roślin PAN) za cenne uwagi i dyskusje dotyczące niniejszego artykułu.

Praca była częściowo finansowana z grantu KBN 6 PO4C 105 12

LITERATURA

- [1] ADAMS T. L., QUIROS C. F. 1985. Somatic hybridization between *Lycopersicon peruvianum* and *L. pennellii*: regenerating ability and antibiotic resistance as selection systems. *Plant Sci.* **40**: 209–219.
- [2] BAJAJ Y. P. S. Protoplast isolation, culture and somatic hybridization. 1977. W: J. REINERT, Y. P. S. BAJAJ (red.), *Plant, cell, tissue, and organ culture*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, s. 467–496.
- [3] BARTKOWIAK E. 1984. Hodowla komórek, otrzymywanie mutantów i mieszańców somatycznych oraz modyfikacja komórek *in vitro*. W: M. ZENKTELER (red.) *Hodowla komórek i tkanek roślinnych*. PWN, Warszawa 1984, s. 312–444.
- [4] BINDING H., KRUMBIEGIEL-SCHROEREN G., NEHLS R. 1986. Protoplast fusion and early development of fusants. W: J. REINERT, H. BINDING (red.), *Differentiation of protoplasts and of transformed plant cells*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, s. 37–66.
- [5] BLACKHALL N. W., DAVEY M. R., POWER J. B. 1994. Applications of protoplast technology. Fusion and selection of somatic hybrids. W: D. A. DIXON, R. A. GONZALES (red.) *Plant cell culture*. IRL Press, New York, Tokyo, s. 41–48.
- [6] BORNMAN C. H., BORNMAN J. F. 1985. Plant protoplast viability. W: P-E. PILET, (red.) *The physiological properties of plant protoplasts*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, s. 29–36.
- [7] CHUPEAU M., BELLINI C., GUERCHA P., MAISONNEUVE B., VASTRA G., CHUPEAU Y. 1989. Transgenic plants of lettuce (*Lactuca sativa*) obtained through electroporation of protoplasts. *Bio/Technol.* **7**: 503–508.
- [8] COCKING E. C. Plant cell protoplasts – isolation and development. 1972. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **23**: 29–50.
- [9] COLLINS G. B., TAYLOR W. L., DEVERNA J. W. 1984. *In vitro* approaches to interspecific hybridization and chromosome manipulation in crop plants. W: J. P. GUSTAFSON (red.), *Gene manipulation in plant improvement*. Plenum Press, New York, s. 323–383.

- [10] CONSTABEL F., KAO K. N. 1974. Agglutination and fusion of plant protoplasts by polyethylene glycol. *Can. J. Bot.* **52**: 1603–1606.
- [11] CSELPO A., NAGY F., MALIGA P. 1984. Interspecific protoplast fusion to rescue a cytoplasmic lincomycin resistance mutation into fertile *Nicotiana plumbaginifolia* plants. *Mol. Gen. Genet.* **198**: 7–11.
- [12] DIXON D. A., GONZALES R. A. (red.) *Plant cell culture*. 1994. IRL Press, New York, Tokyo, ss. 230.
- [13] EIGEL L., OELMUELLER R., KOOP H.-U. 1991. Transfer of defined numbers of chloroplasts into albino protoplasts using an improved subprotoplast/protoplast microfusion procedure: transfer of only two chloroplasts leads to variegated progeny. *Mol. Gen. Genet.* **227**: 446–451.
- [14] ENDO T., KOMIYA T., MASUMITSU Y., MORIKAWA H., YAMADA Y. 1987. An intergeneric hybrid cell line of *Duboisia hopwoodii* and *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. *J. Plant Physiol.* **129**: 453–459.
- [15] ENDO T., KOMIYA T., MINO M., NAKANISHI K., FUJITA S., YAMADA Y. 1988. Genetic diversity among sublines originating from a single somatic hybrid cell of *Duboisia hopwoodii* + *Nicotiana tabacum*. *Theor. Appl. Genet.* **76**: 641–646.
- [16] EVANS D. A., BRANO J. E. 1983. Protoplast isolation and culture. W: D. A. EVANS et al. (red.) *Handbook of Plant Cell Culture*, vol. 1 Macmillan Publ. Co. s. 124–161.
- [17] FAHLESON J., RAAHLEN L., GLIMELIUS K. 1988. Analysis of plants regenerated from protoplast fusions between *Brassica napus* and *Eruca sativa*. *Theor. Appl. Genet.* **76**: 507–512.
- [18] FAMELAER I., GLEBA Y. Y., SIDOROV V. A., KALEDA V. A., PARAKONNY A. S., BORYSHUK N. V., CHEREB N. N., NEGRUTIU I., JACOBS M. 1989. Intrageneric asymmetric hybrids between *Nicotiana plumbaginifolia* and *Nicotiana sylvestris* obtained by „gamma-fusion”. *Plant Sci.* **61**: 105–117.
- [19] FAMELAER I., NEGRUTIU I., MOURAS A., VAUCHERET H., JACOBS M. 1990. Asymmetric hybridization in *Nicotiana* by „gamma-fusion” and progeny analysis of self-fertile hybrids. *Theor. Appl. Genet.* **79**: 513–520.
- [20] FITTER M. S., KRİKORIAN A. D. 1982. Plant protoplasts. Some guidelines for their preparation and manipulation in culture. *Behring Diagnostics*, s. 3–26.
- [21] FITZSIMONS P. J., WEYERS J. D. B. 1985. Properties of some enzymes used for protoplast isolation. W: P.-E. PILET, (red.) *The physiological properties of plant protoplasts*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, s. 14–23.
- [22] FLICK C. E., KUT S. A., BRAVO J. E., GLEBA Y. Y., EVANS D. A. 1985. Segregation of organelle traits following protoplast fusion in *Nicotiana*. *Bio/Technology* **3**: 555–560.
- [23] GLEBA Y. Y., HOFFMANN F. 1979. No evidence for specific chromosome elimination. *Mol. Gen. Genet.* **165**: 257–264.
- [24] GLEBA Y. Y., KOMARNITSKY I. K., KOLESNIK N. N., MESHKENE I. V., MARTYN G. I. 1985. Transmission genetics of the somatic hybridization process in *Nicotiana* II. Plastome heterozygotes. *Mol. Gen. Genet.* **198**: 476–481.
- [25] GLEBA Y. Y., PARAKONNY A. S., KOTOV V. N., NEGRUTIU I., MOMOT V. P. 1987. Spatial separation of parental genomes in hybrids of somatic plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 3709–3713.
- [26] GLEBA Y. Y., HINNISDAELS S., SIDOROV V. A., KALEDA V. A., PARAKONNY A. S., BORYSHUK N. V., CHEREB N. N., NEGRUTIU I., JACOBS M. 1988. Intrageneric asymmetric hybrids between *Nicotiana plumbaginifolia* and *Atropa beladonna* obtained by „gamma-fusion”. *Theor. Appl. Genet.* **76**: 760–766.
- [27] GLEBA Y. Y., SHLUMUKOV L. R. 1990. Somatic hybridization and cybridization. W: *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*. BHOJWANI S. S., (red.) Elsevier Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, s. 316–345.
- [28] GLEDDIE S., KELLER W. A., SETTERFIELD G. 1986. Production and characterization of somatic hybrids between *Solanum melongena* L. and *S. sisimbriifolium* Lam. *Theor. Appl. Genet.* **71**: 613–621.
- [29] GROSSER J. W., GMITTER F. G. JR, CHANDLER J. L. 1988. Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus sinensis* and *Severinia disticha*. *Theor. Appl. Genet.* **75**: 397–401.
- [30] GUERCHE P., CHARBONNIER M., JOUANIN L., TOURNEUR C., PASZKOWSKI J., PELLATIER G. 1987. Direct gene transfer by electroporation in *Brassica napus*. *Plant Sci.* **52**: 111–116.
- [31] GURI A., SINK K. C. 1988. Organelle composition in somatic hybrids between an atrazine resistant biotype of *Solanum nigrum* and *Solanum melongena*. *Plant Sci.* **58**: 51–58.
- [32] HAMILL J. D., WATTS J. W., KING J. M. 1987. Somatic hybridization between *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana plumbaginifolia* by electrofusion of mesophyll protoplasts. *J. Plant. Physiol.* **129**: 111–118.
- [33] HAUPTMANN R. M., WIDHOLM J. M. 1983. Carrot and tobacco somatic cell hybrids selected by amino acid analog resistant complementation. *TCA Report*, **17**: 7–8.
- [34] HEIN T., PRZEWONY T., SCHIEDER O. 1983. Culture and selection of somatic hybrids using an auxotrophic cell line. *Theor. Appl. Genet.* **64**: 119–122.
- [35] HINNISDAELS S., BARILLER L., MOURAS A., SIDOROV V., DEL-FAVERO J., VEUSKENS J., NEGRUTIU I., JACOBS M. 1991. Highly asymmetric intergeneric nuclear hybrids between *Nicotiana* and *Petunia*: Evidence for recombinogenic and translocation events in somatic hybrid plants after „gamma”-fusion. *Theor. Appl. Genet.* **82**: 609–614.
- [36] HORSCH R. B., FRY J. E., HOFFMANN N. L., WALLROTH M., EICHHOLTZ D., ROGERS S. G., FRALEY R. T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**: 1229–1231.
- [37] KLEIN T. M., WOLF E. D., WU R., SANFORD J. C. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**: 727–730.
- [38] KOLLMAN R., DOORR I. 1969. Strukturelle Grundlagen des zwischenzelligen Stoffaustausches. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **82**: 415–425.

- [39] KRENS F. A., MOLENDIJK L., WULLEMS G. J., SCHILPE-ROORT R. A. 1982. In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature*, **296**: 72–74.
- [40] LEIBLE M. B., SHOEMAN R. L., SCHWEIGER H. G. 1982. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, a marker for chloroplast species specificity in *Acetabularia*. *Biochim. Biophys. Acta* **699**: 60–66.
- [41] LEGOOD R. C., WALKER D. A. 1985. Chloroplasts and protoplasts. W: J. COOMBS et al. (red.) *Techniques in bioproductivity and photosynthesis*. Pergamon Press, Oxford, s. 118–132.
- [42] LINDSEY K., JONES M. G. K. 1992. *Plant biotechnology in agriculture*. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, ss. 94–127.
- [43] MAHESHWARI S. C., GILL R., MAHESHWARI N., GHARYAL P. K. 1986. Isolation and regeneration of protoplasts from higher plants. W: J. REINERT, H. BINDING (red.), *Differentiation of protoplasts and of transformed plant cells*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, s. 3–35.
- [44] MARTON L., WULLEMS G. J., MOLENDIJK L., SCHILPE-ROORT R. A. 1979. In vitro transformation of cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* **277**: 129–131.
- [45] MARTON L., BIASINI G., MALIGA P. 1985. Co-segregation of nitratereductase activity and normal regeneration ability in selfed sibs of *Nicotiana plumbaginifolia* somatic hybrids, heterozygotes for nitrate-reductase deficiency. *Theor. Appl. Genet.* **70**: 340–344.
- [46] McCABE D. E., SWAIN W. F., MARTINELL B. J., CHRISTOU P. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *BioTechnology* **6**: 923–926.
- [47] 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* protoplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 6832–6836.
- [48] MENCZEL L., NAGY F., LAZAR G., MALIGA P. 1983. Transfer of cytoplasmic male sterility by selection for streptomycin resistance after protoplast fusion in *Nicotiana*. *Mol. Gen. Genet.* **189**: 365–369.
- [49] MISZALSKI Z. 1995. Zastosowanie protoplastów w niektórych badaniach fizjologicznych. W: F. DUBERT, A. SKOCZOWSKI (red.), *Zastosowanie kultur in vitro w fizjologii roślin*. Kraków, ZFR PAN im. Franciszka Górskiego, s. 85–88.
- [50] NADOLSKA-ORCZYK A. 1991. Zmienność somaklonalna jako źródło zmienności genetycznej. *Biotechnologia*, **3–4**: 120–126.
- [51] NEGRUTIU I., HINNISDAELS S., CAMMAERTS D., CHERDSHEWASERT W. 1992. Plant protoplasts as genetic tool: Selectable markers for developmental studies. *Int. J. Dev. Biol.* **36**: 73–84.
- [52] NEHLS R., KRUMBIEGEL-SCHROEREN G., BINDING H. 1986. Development of protoplast fusion products. W: J. REINERT, H. BINDING (red.), *Differentiation of protoplasts and of transformed plant cells*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, s. 67–108.
- [53] NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., MALESZY S. 1989. Otrzymywanie i wykorzystanie mieszańców form oddalonych. W: MALESZY S., NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., PRZYBECKI Z. *Biotechnologia w genetyce i hodowli roślin*. PWN, W-wa, s. 81–150.
- [54] PERL A., ARIR D., GRESSEL J. 1985 Transfer of atrazine resistance from *Solanum tuberosum* by protoplast fusion. *Newsletter IAPTC* **47**: 15.
- [55] PIWOWARCZYK W. 1980. Hodowla protoplastów roślinnych in vitro. *Wiad. Bot.* **24**: 127–138.
- [56] PRESZNER J., FEHER A., VEISZ O., SUTKA J., DUDITS D. 1992. Characterization of morphological variation and cold resistance in interspecific somatic hybrids between potato (*Solanum tuberosum* L.) and *S. brevidens* Phil. *Euphytica* **57**: 37–49.
- [57] PRZYBECKI Z., MALESZY S. 1992. Molekularne podstawy zmienności somaklonalnej roślin. *Biotechnologia* **3**: 30–41.
- [58] REDDY C. R. K., IMA M., FUJITA Y. 1992. Induction of fast-growing and morphologically different strains through intergeneric protoplast fusions of *Ulva* and *Enteromorpha* (*Ulvales*, *Chlorophyta*). *J. Appl. Phycol.* **4**: 57–65.
- [59] REICH T. J., IYER V. N., MIKI B. L. 1986. Efficient transformation of alfalfa protoplasts by intranuclear injection of Ti plasmids. *Bio/Technol.* **4**: 1001–1004.
- [60] RHODES C. A., PIERCE D. A., METTLER I. J., MASCARENHAS D., Detmer J. J. 1988. Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science*, **240**: 204–207.
- [61] ROSEN B., HALLDEN C., HENEEN W. K. 1988. Diploid *Brassica napus* somatic hybrids: Characterization of nuclear and organellar DNA. *Theor. Appl. Genet.* **76**: 197–203.
- [62] RUESNIK A. 1980. Protoplasts of plant cells. W: *Methods in Enzymology* vol. 69, (red.) SAN PIETRO A., Academic Press, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, s. 69–84.
- [63] SCHIEDER O. 1978. Somatic hybrids of *Datura innoxia* Mill. + *Datura discolor* Bernh. and *Datura innoxia* Mill. + *Datura stramonium* L. var. *tatula* L. I. Selection and characterization. *Mol. Gen. Genet.* **162**: 113–119.
- [64] SCHNABELRAUCH L. S., KLOC-BAUCHAN F., SINK K. C. 1985. Expression of nuclear-cytoplasmic genomic incompatibility in interspecific *Petunia* somatic hybrid plants. *Theor. Appl. Genet.* **70**: 57–65.
- [65] SHOENMAKERS H. C. H., WOLTERS A. M. A., NOBEL E. M., DEKLEIN C. M. J., KOORNNEEF M. 1993. Allotriploid somatic hybrids of diploid tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and monoploid potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor. Appl. Genet.* **87**: 328–336.
- [66] SHOENMAKERS H. C. H., VANDERMEULENUIJSERS J. J. M., KOORNNEEF M. 1994. Asymmetric fusion between protoplasts of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and gamma-irradiated protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* L.) – the effect of gamma irradiation. *Mol. Gen. Genet.* **242**: 313–320.
- [67] SHILLITO R. D., SAUL M. W. 1988. Protoplast isolation and transformation. W: *Plant molecular biology – a practical approach*. (red.) SHOW CH., IRL Press, Oxford, s. 161–186.

- [68] SHIMAMOTO K., TERADA R., IZAWA T., FUJIMOTO H. 1989. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* **338**: 274–276.
- [69] SIHACHAKR D., HAICOUR R., CHAOUT M.-H., BARRIENTOS E., DUCREUX G., ROSSIGNOL L. 1989. Somatic hybrid plants produced by electrofusion between *Solanum melongena* L. and *Solanum torvum* Sw. *Theor. Appl. Genet.* **77**: 1–6.
- [70] SJODIN C., GLIMELIUS K. 1989. *Brassica naponigra*, a somatic hybrid resistant to *Phoma lingam*. *Theor. Appl. Genet.* **77**: 651–656.
- [71] SJODIN C., GLIMELIUS K. 1989. Transfer of resistance against *Phoma lingam* to *Brassica napus* by asymmetric somatic hybridization combined with toxin selection. *Theor. Appl. Genet.* **78**: 513–520.
- [72] SUN S., FURTULA V., NOTHNAGEL E. A. 1992. Mechanical release and lectin labeling of maize protoplasts. *Protoplasma* **169**: 49–56.
- [73] SUNDBERG E., GLIMELIUS K. 1991. Production of hybrid plants within *Brassicaceae* by fusing protoplasts and plasmolytically induced cytoplasts. *Plant. Sci.* **79**: 205–216.
- [74] TEMPELAAR M. J., JONES M. G. K. 1985. Fusion characteristics of plant protoplasts in electric fields. *Planta* **165**: 205–206.
- [75] TEMPELAAR M. J., DUYST A., DE VLAS S. Y., KROL G., SYMONS C., JONES M. G. K. 1987. Modulation and direction of the electrofusion response in plant protoplasts. *Plant Sci.* **48**: 99–105.
- [76] VAN WERT S. L., SAUNDERS J. A. 1992. Electrofusion and electroporation of plants. *Plant Physiol.* **99**: 365–367.
- [77] VARDI A., GALUN E. 1988. Recent advances in protoplast culture of horticultural crops *Citrus*. *Sci. Hortic.* **37**: 217–230.
- [78] WAARA S., TEGELSTROM H., WALLIN A., ERIKSSON T. 1989. Somatic hybridization between anther-derived dihaploid clones of potato *Solanum tuberosum* L. and the identification of hybrid plants by isozyme analysis. *Theor. Appl. Genet.* **77**: 49–56.
- [79] WEBB J. K., WOODSTOCK S., CHAMBERLAIN D. A. 1987. Plant regeneration from protoplasts of *Trifolium repens* and *Lotus corniculatus*. *Plant Breeding* **98**: 111–118.
- [80] WEBER G., CONSTABEL F., WILLIAMS F., FOWKE L., GAMBORG O. L. 1976. Effect of preincubation of protoplasts on PEG-induced fusion of plant cells. *Z. Pflanzenphysiol.* **79**: 64–80.
- [81] WIENKEN J., ZIMMERMANN U., ZENNER H. P., COAKLEY W. T., GOULA R. K. 1985. Electro-acoustic fusion of cells. *Naturwissenschaften* **72**: 441–442.
- [82] YAMADA T. 1989. Selection of a highly-regenerative genotype of white clover (*Trifolium repens* L.) and plant regeneration from protoplast derived from this genotype. *Euphytica* **44**: 181–186.
- [83] YAMASHITA Y., TERADA R., NISHIBAYASHI S., SHIMAMOTO K. 1989. Asymmetric somatic hybrids of *Brassica*. Partial transfer of *Brassica campestris* genome into *Brassica oleracea* by cell fusion. *Theor. Appl. Genet.* **77**: 189–194.
- [84] ZHANG W., WU R. 1988. Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. *Theor. Appl. Genet.* **76**: 835–840.
- [85] ZIMMERMANN U., WIENKEN J. 1982. Electric field induced cell to cell fusion. *J. Membrane Biol.* **67**: 165–170.