

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin

- Państwowy Instytut Badawczy

w Radzikowie

Paulina Smyda-Dajmund

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

Charakterystyka somatycznych mieszańców *Solanum* × *michoacanum* (+) *S. tuberosum* i autofuzantów 4x *S.* × *michoacanum* oraz wykorzystanie ich do rozszerzenia puli hodowlanej ziemniaka uprawnego *S. tuberosum* L.

Promotor: dr hab. Jadwiga Śliwka, prof. nadzw. IHAR-PIB,

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin –PIB, Oddział Młochów
Zakład Genetyki i Materiałów Wyjściowych Ziemniaka

Recenzenci: dr hab. inż. Ewa Grzebelus

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa

prof. dr hab. Monika Rakoczy-Trojanowska

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu

Radzików, 2017

WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. Smyda Paulina, Jakuczun Henryka, Dębski Konrad, Śliwka Jadwiga, Thieme Ramona, Nachtigall Marion, Wasilewicz-Flis Iwona, Zimnoch-Guzowska Ewa (2013) Development of somatic hybrids *Solanum* × *michoacanum* Bitter. (Rydb.) (+) *S. tuberosum* L. and autofused 4x *S. × michoacanum* plants as potential sources of late blight resistance for potato breeding. *Plant Cell Reports* 32:1231-41 doi: 10.1007/s00299-013-1422-5
2. Smyda-Dajmund Paulina, Śliwka Jadwiga, Wasilewicz-Flis Iwona, Jakuczun Henryka, Zimnoch-Guzowska Ewa (2016) Genetic composition of interspecific potato somatic hybrids and autofused 4x plants evaluated by DArT and cytoplasmic DNA markers. *Plant Cell Reports* 35:1345-58 doi: 10.1007/s00299-016-1966-2
3. Smyda-Dajmund Paulina, Śliwka Jadwiga, Wasilewicz-Flis Iwona, Jakuczun Henryka, Zimnoch-Guzowska Ewa (2017) BC₁ and F₁ progeny from *Solanum* × *michoacanum* (+) *S. tuberosum* somatic hybrids, autofused 4x *S. michoacanum* and cultivated potato. *American Journal of Potato Research* doi: 10.1007/s12230-017-9568-2

WPROWADZENIE

Zaraza ziemniaka, wywoływana przez *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, organizm grzybopodobny należący do gromady Oomycetes, jest głównym patogenem atakującym uprawy ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) na całym świecie (CIP, 2014). Szacuje się, że roczne straty plonów wynoszą od 10 do 15% (Kamoun i Smart 2005; Park i in. 2009). Globalne straty związane z tą chorobą oraz koszty chemicznej ochrony wynoszą ponad 6 mld dolarów (Haverkort i in. 2008). W Polsce średnie straty plonu wynoszą od 21,6% na północy kraju do 57,2 % na południu Polski (Kapsa 2004). Ochrona chemiczna przed zarazą ziemniaka wymaga licznych zabiegów, jest kosztowna i powoduje zanieczyszczenie środowiska. Wprowadzanie do uprawy odpornych na *P. infestans* odmian ziemniaka, posiadających różne geny odporności pochodzące z dzikich i prymitywnie uprawnych gatunków ziemniaka jest najbardziej ekonomicznym sposobem ochrony przed tą chorobą (Spooner i in. 2014).

Dzikie gatunki ziemniaka są źródłem genów warunkujących odporność na wiele czynników biotycznych i abiotycznych (Zimnoch-Guzowska i in. 2003). Jednak wprowadzenie genów odporności z dzikich gatunków ziemniaka do ziemniaka uprawnego

utrudniają bariery krzyżowalności. Fuzja somatyczna jest często wykorzystywaną metodą przełamywania barier krzyżowalności pomiędzy *S. tuberosum* a dzikimi gatunkami ziemniaka. Technikę tę wykorzystano do przeniesienia z dzikich gatunków ziemniaka do genomu ziemniaka uprawnego odporności na *P. infestans*, wirusy ziemniaka (PVY, PLRV), niczenie, owady żerujące na ziemniaku, choroby bakteryjne oraz stresy abiotyczne (Orczyk i in. 2003). Najczęściej przenoszoną cechą w drodze fuzji somatycznej jest odporność na *P. infestans* oraz PVY. Źródłami odporności na *P. infestans* wykorzystanymi dzięki fuzji somatycznej były *S. pinnatisectum* (Thieme i in. 1997; Szczerbakowa i in. 2005; Chen i in. 2007; Sarkar i in. 2011), *S. bulbocastanum* (Bołtowicz i in. 2005; Helgeson i in. 1998; Rakosy-Tican i in. 2015), *S. cardiophyllum* (Thieme i in. 2004; Chen i in. 2007; Thieme et al. 2010; Chandel i in. 2015), *S. brevidens* (Rokka i in. 1994, 1995), *S. chacoense* (Chen i in. 2007), *S. etuberosum* (Thieme i in. 2004), *S. michoacanum* (Szczerbakowa i in. 2010), *S. nigrum* (Szczerbakowa i in. 2003) oraz *S. tarnii* (Thieme i in. 2004). Fuzja somatyczna może prowadzić do eliminacji całych chromosomów lub ich części, aberracji lub rekombinacji pomiędzy homologicznymi fragmentami chromosomów (Harding i Millam 2000; Orczyk i in. 2003). Ze względu na losowość procesu somatycznej hybrydyzacji prowadzącą do otrzymywania zróżnicowanego materiału genetycznego wskazana jest analiza struktury genomu jądrowego i genomów organelowych mieszańców somatycznych.

CEL BADAŃ

Celem badań było przeniesienie odporności na *Phytophthora infestans*, z dzikiego gatunku o 1EBN, *Solanum* × *michoacanum* do puli genetycznej ziemniaka uprawnego *Solanum tuberosum* L. (4EBN) z wykorzystaniem fuzji protoplastów. Założono zweryfikowanie potencjału metody fuzji somatycznej, jako drogi do wprowadzenia nowej zmienności genetycznej do ziemniaka uprawnego w połączeniu z krzyżowaniami wstecznymi odpornych na *P. infestans* mieszańców somatycznych oraz autofuzantów 4x *S.* × *michoacanum*.

Cele szczegółowe:

1. Uzyskanie w drodze elektrofuzji oraz selekcja w oparciu o cechy fenotypowe w tym morfologiczne, fizjologiczne, cytologiczne oraz markery molekularne mieszańców somatycznych *S.* × *michoacanum* (+) *S. tuberosum* oraz autofuzantów 4x *S.* × *michoacanum*

2. Charakterystyka struktury genomu jądrowego przy wykorzystaniu markerów Diversity Array Technology (DArT) oraz genomów chloroplastowego i mitochondrialnego przy zastosowaniu markerów PCR w mieszańcach somatycznych *S. × michoacanum* (+) *S. tuberosum* i uzyskanych autofuzantach 4x *S. × michoacanum*
3. Uzyskanie potomstwa generatywnego pomiędzy produktami fuzji a ziemniakiem uprawnym i jego charakterystyka fenotypowa z uwzględnieniem oceny przeniesienia do *S. tuberosum*, odporności na *P. infestans* z *S. × michoacanum*

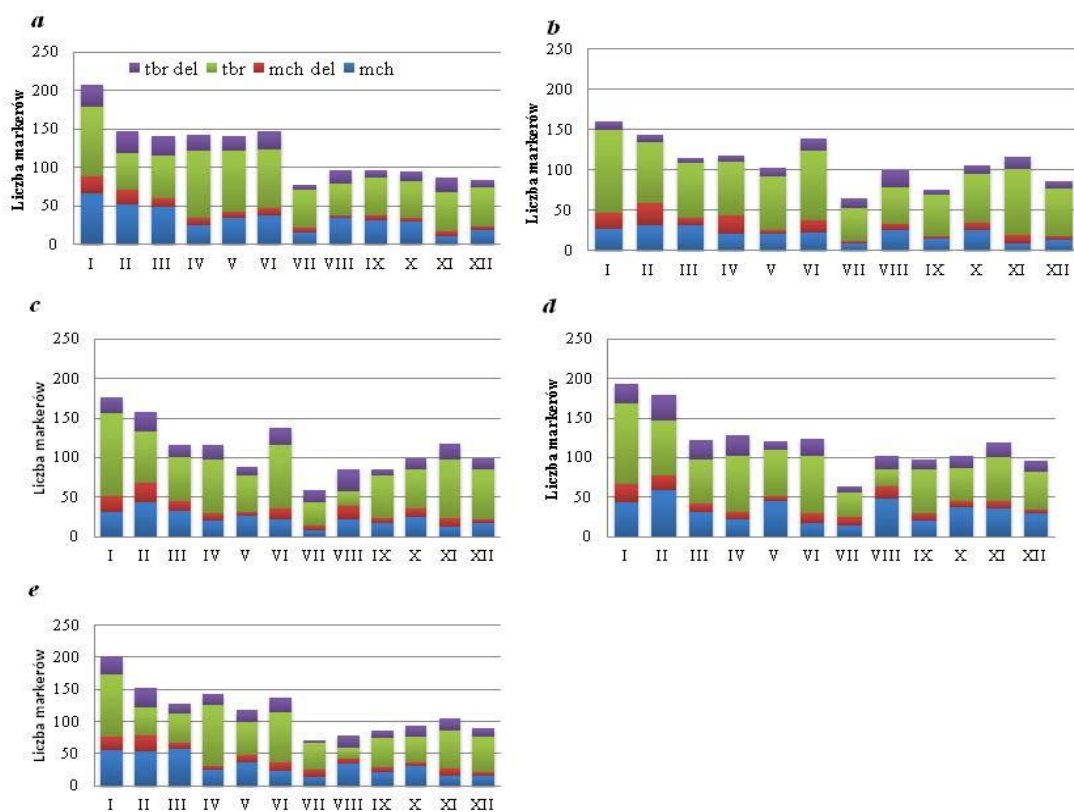
Hipoteza naukowa: Fuzja somatyczna pozwala na ominięcie barier krzyżowalności między niekrzyżującymi się gatunkami *S. × michoacanum* (1EBN) i *S. tuberosum* (2EBN, 4EBN). Otrzymane mieszańce somatyczne krzyżują się z odmianami ziemniaka, co umożliwia wykorzystanie przeniesionej cechy w hodowli ziemniaka.

WYNIKI BADAŃ

W publikacji Smyda i in. (2013) opisano uzyskanie mieszańców somatycznych *S. × michoacanum* (+) *S. tuberosum* odpornych na *P. infestans*. W wyniku elektrofuzji z ośmiu kombinacji fuzyjnych otrzymano 18775 kalusów, z których zregenerowało 1482 roślin. Na podstawie analizy markerami molekularnymi SSR, CAPS i RAPD mieszańcowość potwierdzono dla 228 roślin. Dodatkowo zidentyfikowano 116 autofuzantów, pochodzących z regeneracji połączonych protoplastów dzikiego gatunku. Poziom ploidalności 160 mieszańców z 228 testowanych był 4x, zaś 68 mieszańców wykazywało poziom ploidalności powyżej 4x. Mieszańce somatyczne wykazały pośredni fenotyp pomiędzy formami rodzicielskimi fuzji somatycznej. Wśród uzyskanych mieszańców somatycznych obserwowano także deformacje całych roślin, liści, i bulw oraz kolor kwiatów inny niż u form rodzicielskich. Autofuzanty posiadały większe liście, o szerszych listkach w porównaniu z fenotypem diploidalnego *S. × michoacanum*. 85 mieszańców somatycznych i 113 autofuzantów było męskopłodnych. Średnia odporność na *P. infestans* komponentów fuzji, donorów odporności *mch/8* i *mch/39* wynosiła odpowiednio 8.1 i 8.0. Z kolei odporność podatnych klonów DG 81-68, DG 88-89, dHBard i odmiany Rywał była, odpowiednio, na poziomie 2.3, 2.1, 1.3 i 1.4. Spośród 118 ocenianych mieszańców somatycznych trzy wykazały odporność na zarazę ziemniaka, jednak poziom ich odporności był niższy od form rodzicielskich i wynosił: 7.0, 7.6 i 6.9. Wszystkie testowane autofuzanty były odporne na zarazę ziemniaka, ale ich średnia odporność także była niższa od odporności form wyjściowych ($4x\ mch/8 = 7.5$, $4x\ mch/39 = 7.8$). odporne produkty fuzji wytwarzały bulwy i funkcjonalny pyłek.

Określono kompozycję jądrowego i cytoplazmatycznego genomu mieszańców somatycznych *S. × michoacanum* (+) *S. tuberosum* oraz autofuzantów $4x$ *S. × michoacanum* na podstawie markerów DArT i markerów specyficznych do chloroplastowego i mitochondrialnego DNA (Smyda-Dajmund i in. 2016). Badano powiązania pomiędzy strukturą genomów mieszańców somatycznych a ich odpornością na *P. infestans*. Poziom błąd metody wyznaczono na podstawie analizy struktury genomu jądrowego autofuzantów i wynosił on poniżej 1%. Z 5358 markerów DArT wybrano średnio 2080 markerów na kombinację fuzyjną (od 2011 do 2231 dla pięciu kombinacji fuzyjnych), które wykazały polimorfizm na poziomie form rodzicielskich. Analiza poszczególnych mieszańców somatycznych wykazała, że w genomie wszystkich 97 mieszańców somatycznych z pięciu kombinacji fuzyjnych większość markerów specyficznych dla obojga form rodzicielskich została zachowana. Zaobserwowano brak od 17,5% do 29,6% markerów specyficznych dla *S. × michoacanum* oraz 13,9 – 23,4% markerów specyficznych dla *S. tuberosum*. Z ponad 2000 polimorficznych markerów w każdej kombinacji fuzyjnej wytypowano od 1505 do 1580 markerów DArT ze znaną chromosomową lokalizacją. Nie stwierdzono eliminacji całych chromosomów, ponieważ w genomie wszystkich 97 mieszańców somatycznych obecne były markery specyficzne dla każdego z 12 chromosomów rodzicielskich (Rys. 1). Analizowane mieszańce somatyczne wykazywały zróżnicowanie kompozycji poszczególnych chromosomów wewnątrz i pomiędzy kombinacjami fuzyjnymi. Zaobserwowano także podobieństwa w kompozycji analizowanych chromosomów pomiędzy kombinacjami fuzyjnymi, co zostało potwierdzone analizą statystyczną korelacji rang ($p < 0.05$). Analiza poszczególnych chromosomów w odcinkach 1-5 cM wykazała brak pojedynczych markerów na całej długości każdego z 12 chromosomów. Analiza chromosomu VII, na którym zmapowano gen *Rpi-mch1*, warunkujący odporność na *P. infestans* wykazała wśród większości analizowanych mieszańców somatycznych delecję 37,6% markerów DArT specyficznych dla *S. × michoacanum*, pochodzących z chromosomu VII.

Formy rodzicielskie wykazały zróżnicowany typ cytoplazmy: W, T i D. W poszczególnych mieszańcach występowała cytoplazma tylko jednego z komponentów fuzyji. Stwierdzono losową segregację cytoplazmy w fuzantach pochodzących z kombinacji form o cytoplazmach typu W oraz T oraz nielosową w fuzantach pochodzących z kombinacji cytoplazm W oraz D, które posiadały cytoplazmę typu D. Mieszańce somatyczne o typie D cytoplazmy posiadają więcej markerów DArT, specyficznych do *S. × michoacanum*, co zostało potwierdzone w analizie wariancji ($p = 0.0058$).

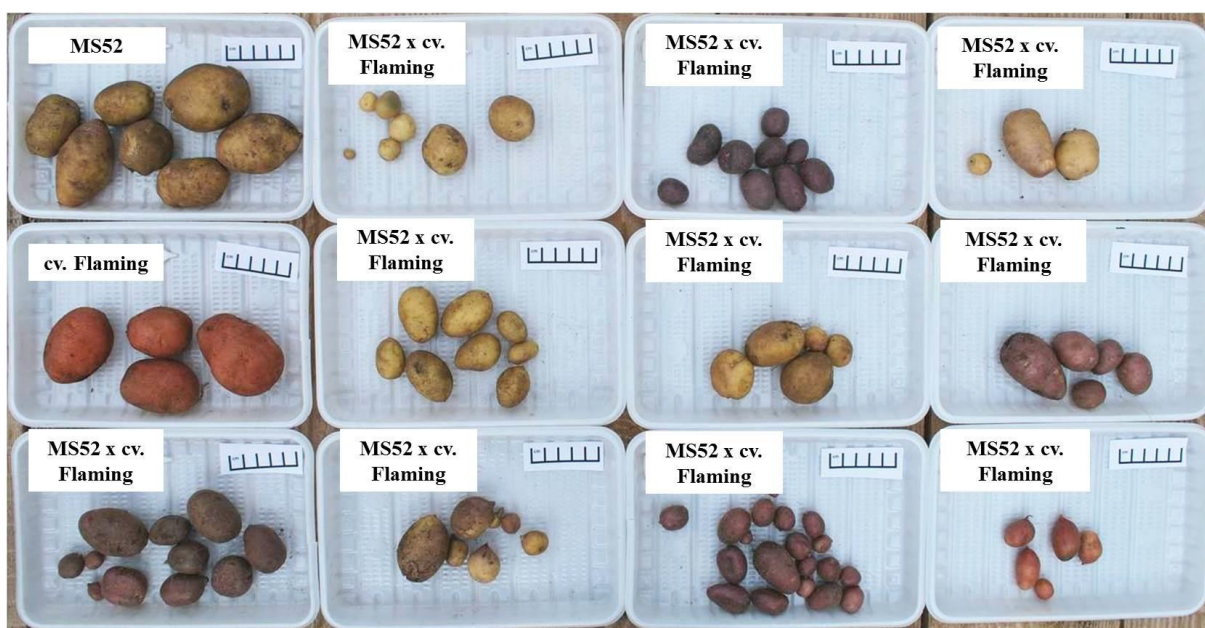


Rys. 1. Kompozycja 12 chromosomów 97 mieszańców somatycznych z pięciu kombinacji fuzyjnych (a-e) przedstawiona w liczbach markerów DArT obecnych (mch, tbr) i nieobecnych (mch del, tbr del) a występujących w genomie form rodzicielskich: mch - *S. × michoacanum*; tbr – *S. tuberosum*

Otrzymano pokolenia BC₁ i F₁ z krzyżowań odpornych na *P. infestans* mieszańców somatycznych i autofuzantów z odmianami ziemniaka (Smyda-Dajmund i in. 2017). Krzyżowania przeprowadzono w obydwu kierunkach pomiędzy produktami fuzji a wyselekcjonowanymi odmianami. W krzyżowaniach, w których produkty fuzji użyte były jako matki przeprowadzono od 52 do 2477 zapyleń na kombinację. Otrzymano ponad 4200 nasion w kombinacjach mieszaniec somatyczny × odmiana oraz 16 nasion z 657 jagód w krzyżowaniach autofuzant × odmiana. Użycie produktów fuzji jako zapylaczy było mniej efektywne, ponieważ z 3311 zapyleń otrzymano pięć jagód, z których wyizolowano 14 nasion w jednej z kombinacji. Z ponad 4000 nasion, uzyskanych z krzyżowań w obydwu kierunkach otrzymano 697 genotypów BC₁ oraz pięć form F₁. 666 z 697 roślin BC₁ było tetraploidalnych, pozostałe 31 roślin posiadało poziom ploidalności powyżej 4x. Wszystkie rośliny F₁ były

tetraploidalne. Z pośród wszystkich osobników pokolenia BC₁, 122 nie kwitły lub charakteryzowały się opadającymi pąkami. Z pięciu genotypów pokolenia F₁, trzy nie kwitły. Pozostałe rośliny BC₁ kwitły i wytwarzały funkcjonalny pyłek. W jednej z kombinacji zaobserwowano segregację koloru skórki bulw (Rys. 2).

Średni poziom odporności odpornych form rodzicielskich MS52, 4x *mch*/8 (N=8) i 4x *mch*/39 (N=3) wynosił odpowiednio 6.7, 7.5 i 7.7. Poziom odporności podatnych odmian Eugenia, Felka Bona, Flaming i Legenda wynosił odpowiednio 1.8, 2.3, 1.9 i 4.1. Po dwóch latach ocen odporności na *P. infestans* z 702 testowanych genotypów 25 genotypów BC₁ i pięć pokolenia F₁ wykazało średnią odporność powyżej 6 i uznane zostały za formy odporne na zarazę ziemniaka. Test statystyczny Dunnetta ($p \leq 0.05$) wykazał, że siedem odpornych genotypów BC₁ z grupy 25 odpornych (średnia odporność ≥ 6) posiadało znacząco wyższy średni poziom odporności w porównaniu do odpornej formy rodzicielskiej MS52. Z pośród tych form dwa tetraploidalne genotypy wykazały oprócz wysokiego poziomu odporności na *P. infestans* męską płodność i dobre cechy agronomiczne.



Rys. 2. Morfologia bulw pokolenia BC₁ otrzymanego z krzyżowań pomiędzy mieszańcem somatycznym MS52 i odmianą Flaming. Zaobserwowano segregację koloru skórki bulw.

WNIOSKI

1. Fuzja somatyczna pozwoliła na ominięcie bariery krzyżowalności między odpornym na *P. infestans* gatunkiem *S. × michoacanum* a podatną formą *S. tuberosum*. Z 18775 kalusów uzyskano 1482 rośliny, z których otrzymano pulę 228 mieszańców

- somatycznych w ośmiu kombinacjach dwóch klonów *S. × michoacanum* z trzema formami *S. tuberosum* (2x) i odmianą Rywal (4x). Mieszańcowość otrzymanych roślin potwierdzono markerami molekularnymi.
2. Mieszańce somatyczne były tetraploidalne (160) lub o ploidalności >4x (68) i wykazywały cechy morfologiczne pośrednie w porównaniu z fenotypami rodziców. W puli otrzymanych mieszańców obserwowano formy wykazujące deformacje całych roślin, liści, bulw oraz rośliny o różnym kolorze kwiatów. W wyniku fuzji powstało także 116 autofuzantów 4x *S. × michoacanum*. 85 mieszańców somatycznych i 113 autofuzantów kwitło i wytwarzało pyłek o prawidłowej morfologii.
 3. Trzy spośród 118 wyselekcjonowanych mieszańców somatycznych wykazały odporność na *P. infestans*. Przyczyny tak niskiej liczby form odpornych prawdopodobnie wynikały ze współdziałania połączonych genomów form rodzicielskich, eliminacji jednego z homologicznych chromosomów niosących gen odporności na *P. infestans*, zmienności somaklonalnej, funkcjonowania nowych oddziaływań jądrowo-cytoplazmatycznych, translokacji czy też delecji fragmentów DNA. Wszystkie oceniane autofuzanty były wysokoodporne na zarazę ziemniaka.
 4. Analiza z użyciem markerów DArT umożliwiła określenie składu genomu jądrowego produktów fuzji. Na podstawie analizy genomów autofuzantów oszacowano błąd metody na < 1%. Wszystkie analizowane mieszańce somatyczne posiadały markery specyficzne dla obojga rodziców na wszystkich 12 chromosomach. Charakterystyczny dla poszczególnych chromosomów układ i proporcja markerów zachowanych i utraconych powtarzały się dla mieszańców ze wszystkich kombinacji.
 5. W mieszańcach wykryto brak 13,9 – 23,4% markerów z *S. tuberosum* i 17,5 – 29,6% markerów z *S. × michoacanum*. Braki markerów wykazano na wszystkich chromosomach, nie stwierdzono eliminacji całych chromosomów lub ich dużych fragmentów. Prawdopodobnym wyjaśnieniem utraty markerów był zmieniony wzór metylacji mieszańców somatycznych na skutek procesu fuzji somatycznej względem stanu obserwowanego dla form rodzicielskich. Enzym *PstI*, wrażliwy na metylację, wykorzystywany w technologii DArT mógł być odpowiedzialny za fragmentację DNA genomu mieszańcowego według nowego wzoru metylacji. Zmiana wzoru metylacji oraz jej potencjalny wpływ na odporność mieszańców na *P. infestans* wymagają potwierdzenia w dalszych badaniach.
 6. Nie wykryto mieszańców somatycznych posiadających chloroplasty i mitochondria obojga form rodzicielskich. W puli mieszańców powstałych po fuzji form

rodzicielskich o typach cytoplazmy W i T rozkład cytoplazmy poszczególnych mieszańców był losowy i wynosił 1:1. W mieszańcach pomiędzy typem W i D zaobserwowano kierunkową segregację cytoplazmy i wystąpienie jedynie typu D. Mieszańce somatyczne o typie cytoplazmy D posiadają w genomie jądrowym więcej markerów DArT, specyficznych do *S. × michoacanum*, co wskazuje, że ten typ cytoplazmy lepiej współdziała z genomem jądrowym *S. × michoacanum* niż typ W, który oryginalnie występuje w tym gatunku.

7. Zwiększenie poziomu ploidalności *S. × michoacanum* do poziomu 4x nie zwiększyło efektywności jego krzyżowań z tetraploidalnym *S. tuberosum*. Wskazuje to na istnienie dodatkowych mechanizmów wpływających na proces krzyżowania tych dwóch gatunków.
8. W 20 kombinacjach krzyżówkowych pomiędzy mieszańcami somatycznymi i autofuzantami a odmianami ziemniaka, z 13636 zapyleń uzyskano 697 roślin BC₁ i pięć roślin F₁, spośród których 15 osobników BC₁ i jeden osobnik pokolenia F₁ były równocześnie płodne i odporne na *P. infestans*, co umożliwia wprowadzenie odporności z *S. × michoacanum* do programów hodowlanych ziemniaka. Niska wydajność transferu odporności stanowi poważne ograniczenie dla wykorzystania tej metody w praktyce.

SPIS LITERATURY

- Bołtowicz D, Szczerbakowa A, Wielgat B (2005) RAPD analysis of the interspecific somatic hybrids *Solanum bulbocastanum* (+) *S. tuberosum*. *Cell Mol Biol Lett* 10:151-162
- Chandel P, Tiwari JK, Ali N, Devi S, Sharma S, Sharma S, Luthra SK, Singh BP (2015) Interspecific potato somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. cardiophyllum*, potential sources of late blight resistance breeding. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 123:579-589
- Chen Q, Li HY, Shi YZ, Beasley D, Bizimungu B, Goettel MS (2007) Development of an effective protoplast fusion system for production of new potatoes with disease and insect resistance using Mexican wild potato species as gene pools. *Can J Plant Sci* 88:611-619
- Harding K, Millam S (2000) Analysis of chromatin, nuclear DNA and organelle composition in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. sanctae-rosae*. *Theor Appl Genet* 101:939-947
- Haverkort AJ, Boonekamp PM, Hutten R, Jacobsen E, Lotz LAP, Kessel, Visser RGF, van der Vossen EAG (2008) Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Res* 51:47-57
- Helgeson JP, Pohlman D, Austin S, Haberlach GT, Wielgus SM, Ronis D, Zambolim L, Tooley P, McGrath JM, James RV, Stevenson WR (1998) Somatic hybrids between

- Solanum bulbocastanum* and potato: a new source of resistance to late blight. *Theor Appl Genet* 96:738-742
- Kamoun S, Smart CD (2005) Late blight of potato and tomato in the genomics era. *Plant Dis* 89:692-699
- Kapsa J (2004) Zmiany stanu zagrożenia i ochrony plantacji ziemniaka przed zarazą (*P. infestans*) w Polsce na tle krajów europejskich. – *Prog Plant Prot* 44:129-137
- Orczyk W, Przetakiewicz J, Nadolska-Orczyk A (2003) Somatic hybrids of *Solanum tuberosum* – application to genetics and breeding. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 74:1-13
- Park TH, Vleeshouwers VGA, Jacobsen E, van der Vossen E, Visser RGF (2009) Molecular breeding for resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in potato (*Solanum tuberosum* L.): a perspective of cisgenesis. *Plant Breed* 128:109-117
- Rakosy-Tican E, Ramona T, Nachtigall M, Molnar I, Denes RE (2015) The recipient potato cultivar influences the genetic makeup of the somatic hybrids between five potato cultivars and one cloned accession of sexually incompatible species *Solanum bulbocastanum* Dun. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 122:395-407
- Rokka VM, Xu YS, Kankila J, Kuusela A, Pulli S, Pehu E (1994) Identification of somatic hybrids of dihaploid *Solanum tuberosum* lines and *S. brevidens* by species specific RAPD patterns and assessment of disease resistance of the hybrids. *Euphytica* 80:207-2017
- Rokka VM, Valkonen JPT, Pehu E (1995) Production and characterization of haploids derived from somatic hybrids between *Solanum brevidens* and *S. tuberosum* through anther culture. *Plant Sci* 112:85-95
- Sarkar D, Tiwari JK, Sharma S, Poonam, Sharma S, Gopal J, Singh BP, Luthra SK, Pandey SK, Pattanayak D (2011) Production and characterization of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* L. and *S. pinnatisectum* Dun. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 107:427-440
- Spooner DM, Ghislain M, Simon R, Jansky S, Gavrilenko T (2014) Systematics diversity, genetics, and evolution of wild and cultivated potatoes. *Bot Rev* 80:283-383
- Szczerbakowa A, Maciejewska U, Zimnoch-Guzowska E, Wielgat B (2003) Somatic hybrids *Solanum nigrum* (+) *S. tuberosum*: morphological assessment and verification of hybridity. *Plant Cell Rep* 21:577-584
- Szczerbakowa A, Bołtowicz D, Lebecka R, Radomski P, Wielgat B (2005) Characteristic of the interspecific somatic hybrids *Solanum pinnatisectum* (+) *S. tuberosum* H-8105. *Acta Physiol Plant* 27:317-25
- Szczerbakowa A, Tarwacka J, Oskiera M, Jakuczun H, Wielgat B (2010) Somatic hybridization between the diploids of *S. × michoacanum* and *S. tuberosum*. *Acta Physiol Plant* 32:867-873
- Thieme R, Darsow U, Gavrilenko T, Dorokhov D, Tiemann H (1997) Production of somatic hybrids between *S. tuberosum* L. and late blight resistant Mexican wild potato species. *Euphytica* 97:189-200
- Thieme R, Darsow U, Rakosy-Tican L, Kang Z, Gavrilenko T, Antonova O, Heimbach U, Thieme T (2004) Use of somatic hybridization to transfer resistance to late blight and *Potato Virus Y* (PVY) into cultivated potato. *Plant Breed Seed Sci* 50:113-118
- Thieme R, Rakosy-Tican E, Nachtigall M, Schubert J, Hammann T, Antonova O, Gavrilenko T, Heimbach U, Thieme T (2010) Characterization of the multiple resistance traits of somatic hybrids between *Solanum cardiophyllum* Lindl. and two commercial potato cultivars. *Plant Cell Rep* 29:1187–1201
- Zimnoch-Guzowska E, Lebecka R, Kryszczuk A, Maciejewska U, Szczerbakowa A, Wielgat B (2003) Resistance to *Phytophthora infestans* in somatic hybrids of *Solanum nigrum* L. and diploid potato. *Theor Appl Genet* 107:43-48