

Teresa Doroszevska, Anna Czubscka

*Institut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa - Państwowy Institut Badawczy
w Puławach*

OCENA ODPORNOŚCI ODMIAN I LINII HODOWLANYCH TYTONIU
NA WIRUSA Y ZIEMNIAKA (PVY)*

Wstęp

Główne kierunki prac hodowlanych nad tytoniem wyznaczane są zapotrzebowaniem przemysłu na surowiec o dobrych cechach jakościowych oraz wymaganiami producentów surowca dotyczącymi stabilnego plonowania, nierozzerwalnie połączonego ze zdrowotnością uprawianych roślin, decydującą o opłacalności uprawy. Straty wynikające z obniżki plonów i złej jakości surowca powodowanej przez choroby sprawiają, że hodowla odpornościowa zajmuje istotne miejsce w badaniach. Ważnym problemem w uprawie tytoniu są choroby wirusowe, co wynika z bardzo ograniczonych możliwości ich zwalczania, polegających głównie na eliminacji wektorów (najczęściej owadów) będących nosicielami wielu wirusów. W przypadku wirusa Y ziemniaka *Potato virus Y* (PVY), a zwłaszcza jego nekrotycznych szczepów powodujących brunatną nekrozę nerwów liści tytoniu metoda zwalczania wektorów, którymi są mszyce, jest również mało skuteczna. Wynika to ze sposobu przenoszenia wirusa, określanego mianem „nietrwalego” (23). Najbardziej odpowiednią metodą ograniczającą rozwój choroby jest wprowadzanie do uprawy odmian odpornych. Hodowla odmian odpornych jest jednak ograniczona wąskim zakresem źródeł odporności, z których większość nie jest efektywna w zetknięciu z nowymi izolatami PVY występującymi zarówno w Polsce, jak też w wielu krajach świata (10, 11). Poszukiwanie odporności jest nieustannym wyścigiem zdarzeń genetycznych w genomach gospodarza i patogena, przy czym zdolność adaptacyjna patogena jest znacznie większa niż możliwości obronne gospodarza, co wynika z dużej częstotliwości mutacji i rekombinacji w genomie wirusa, powodujących skuteczne przełamywanie mechanizmów obronnych rośliny. Stwarza to określone warunki rozwoju choroby i potrzebę systematycznego przeciwstawiania wzrastającym zagrożeniom. W wyniku wieloletnich prac hodowlanych w Polsce i na świecie uzyskano odmiany i materiały wyjściowe niosące różne źródła odporności na PVY.

* Opracowanie wykonano w ramach zadania 2.7 w programie wieloletnim IUNG - PIB

Celem badań było porównanie efektywności odporności odmian i linii hodowlanych tytoniu na różne izolaty PVY.

Material i metody

W badaniach przeprowadzonych w latach 2003–2007 uwzględniono odmiany oraz linie hodowlane i transgeniczne niosące różne czynniki odporności na PVY.

Odmiany:

- Virgin A Mutant (VAM) – odmiana niemiecka należąca do typu papierosowego jasnego – niosąca gen *va*, uzyskana w wyniku działania promieniami X (17); odporna na większość izolatów PVY, zwłaszcza z grupy PVY^{NW} (4, 11, 22);
- Wiślica – polska odmiana należąca do typu papierosowego jasnego, uzyskana w wyniku hodowli klasycznej; odporna na większość izolatów PVY, zwłaszcza z grupy PVY^{NW} (4, 9);
- PBD 6 – odmiana należąca do typu papierosowego ciemnego, uzyskana w Bergerac (Francja) w wyniku selekcji z krzyżówki odmian paragwajskiej i Bel 61-10 (22); odporna na większość izolatów PVY;
- V. SCR – odmiana niemiecka należąca do typu papierosowego jasnego; odporność na PVY uzyskana metodą selekcji masowej (2);
- TN 86 – odmiana amerykańska należąca do typu Burley, odporność na PVY pochodząca od odmiany VAM;
- Samsun H – odmiana podatna na wszystkie nekrotyczne izolaty PVY

Linie hodowlane niosące odporność od dzikiego gatunku *Nicotiana africana*:

- BPA – stabilna linia hodowlana uzyskana w wyniku hodowli z mieszańca międzygatunkowego *N. tabacum* BP-210 z *N. africana* (10);
- WABPA2, WABPA3 – linie hodowlane uzyskane w wyniku selekcji z krzyżówki wielokrotnej z udziałem linii BPA;
- *Nicotiana africana* – dziki gatunek charakteryzujący się wysoką odpornością na PVY (9, 20).

Linie transgeniczne: Mac Nair 944 LMV CP, K 326 LMV CP, BY 103 LMV CP, MN 944 ROKY1, K 326 ROKY1, BY 103 ROKY1, AC Gayed ROKY1, K 326 ROKY2, BY 103 ROKY2, AC Gayed ROKY2 (6, 8). Linie transgeniczne zawierają następujące konstrukcje:

- LMV CP niosącą gen białka płaszczka wirusa mozaiki sałaty; plazmid pKY-LXLMVCP otrzymano od dr S. Dinant (INRA, Francja) w postaci bakterii *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 transformowanych tą konstrukcją (7);
- pROKY niosącą zmodyfikowany gen polimerazy RNA wirusa PVY w orientacji sensownej (ROKY1) i w orientacji antysensownej (ROKY2), została przygotowana w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie (3).

Ocena odporności

Badania odporności pięciu odmian (VAM, Wiślica, PBD6, TN 86, V. SCR) prowadzono w latach 2003–2007, w warunkach polowych w ramach działalności międzynarodowej organizacji CORESTA (Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco) w programie „The Sub-Group Collaborative Study on Potato virus Y”. Ocenę odporności na występujące na danym terenie izolaty prowadzono w doświadczeniach polowych metodą bloków kompletnie zrandomizowanych, w czterech powtórzeniach, po około 40 roślin w jednym powtórzeniu. Obserwacje objawów chorobowych prowadzono systematycznie. Doświadczenia zlokalizowane były na Węgrzech, w Kolumbii, Szwajcarii, Polsce, Niemczech, Francji, Macedonii, we Włoszech, w Zimbabwie, Chinach, Iranie, Chorwacji i w Korei Płd.

Testy biologiczne prowadzono w warunkach szklarniowych metodą inokulacji. W badaniach uwzględniono izolaty PVY należące do grup PVY^{NW} i PVY^{NTN}, pozyskane z tytoniu w Polsce. Inokulacje roślin poszczególnych odmian i linii hodowlanych wykonywano w szklarni i w fitotronie. Celem eliminacji dodatkowej infekcji wirusem mozaiki tytoniowej (TMV), zwłaszcza izolatów pochodzących z pola, do namnożenia inokulum stosowano odmianę Samsun H odporną na TMV i bardzo podatną na wszystkie szczepy PVY. Po wystąpieniu typowych objawów chorobowych PVY pobierano liście wierzchołkowe, ucierano w morderzu i wyciskano sok, którym zakażano posypane karborundem rośliny przeznaczone do testowania. Inokulacje prowadzono w stadium 5–6 liści każdym z badanych w danym doświadczeniu izolatem. W ciągu 48 h zakażone rośliny chroniono przed bezpośrednim wpływem światła. Obserwacje prowadzono trzykrotnie – po 7, 10 i 15 dniach. Po czterech tygodniach od inokulacji wykonywano testy DAS-ELISA (Double-Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay; 5), używając przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko różnym szczepom wirusa Y (MoAbs anti Y) – IgG112911, określanym dalej jako ELISA 1, oraz skierowanych przeciwko szczepom nekrotycznym tego wirusa (MoAbs anti Y^N) – IgG112712, określanym dalej jako ELISA 2. Przeciwciała są produkowane przez firmę BIOREBA (15). Badania odpornościowe linii transgenicznych poprzedzone były badaniem obecności transgenów.

Analiza molekularna roślin transgenicznych

Z liści roślin transgenicznych pobierano 200–250 mg blaszki liściowej i rozcierano w morderzu do uzyskania jednolitej masy. Dodawano 1 ml podgrzanego do 60°C buforu do ekstrakcji (100 mM Tris-HCl, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 0,2% β-merkaptotanol). Po zlaniu do próbki mieszaninę worteksowano przez 5–10 sekund, a następnie inkubowano 30 min. w temp. 60°C. Po schłodzeniu do temperatury pokojowej dodawano 1 objętość mieszaniny chloroform i alkohol izoamylowy w stosunku 24 : 1. Ekstrahowano mieszając przez 5 min., a następnie wirowano 15 min. przy 14 krpm i temperaturze 4°C. Do zebranej fazy wodnej dodawano 1V schłodzonego izopropanolu i wstawiano do zamrażarki na 15 min. dla lepszego wytrącenia

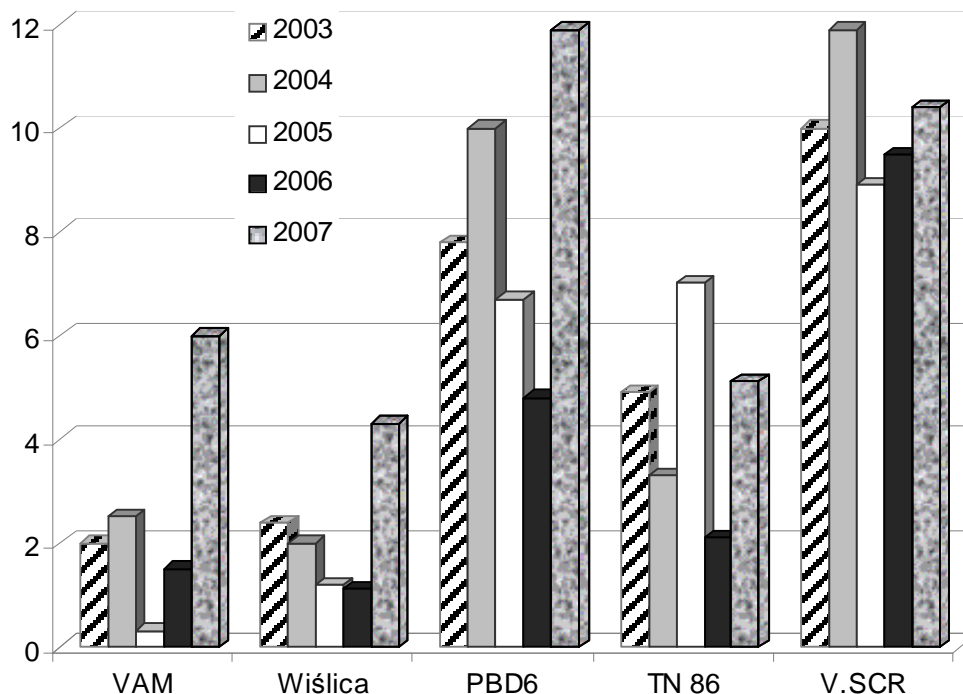
DNA. Wytrącone DNA wyławiano i przenoszono do buforu płuczącego (76% etanol, 10 mM octan amonu). Po zwirowaniu osad przepłukiwano 2-krotnie 70% zimnym etanolem, suszono próżniowo, zawieszano w 20 ml sterylnej wody i przechowywano w temp. -20°C .

Potwierdzenie obecności transgenu roślin prowadzono stosując reakcję łańcuchową polimerazy – PCR (ang. Polymerase Chain Reaction). Mieszanina reakcyjna do PCR w przeliczeniu na jedną próbkę o objętości 50 μl zawierała: przy detekcji genu LMV CP: 0,5 x PCR bufor, 2 ml 25 mM MgCl_2 , 1 ml 10 mM dNTPs, po 25 ng specyficznych starterów, 0,75 jednostki polimerazy firmy Fermentas, 1 ml matrycy DNA; przy detekcji genu ROKY1 lub ROKY2: 0,5 x PCR bufor, 4,5 ml 25 mM MgCl_2 , 3,6 ml 10 mM dNTPs, po 180 ng specyficznych starterów, 0,9 jednostki polimerazy firmy Fermentas, 1 ml matrycy DNA. Amplifikację prowadzono przy następujących parametrach: 94°C – 4 min; 30 cykli: 95°C – 30 s, 58°C – 30 s, 72°C – 45 s; 72°C – 10 min. Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym z dodatkiem 0,2 mg/ml bromku etydy, w buforze 1 x TBE (100 mM Tris, 90 mM H_3BO_3 , 1 mM EDTA, pH 8,5) przy napięciu 7-10 V/cm. Wizualizację wyników elektroforezy prowadzono w świetle UV transiluminatora.

Wyniki i dyskusja

Ocenę odporności pięciu odmian tytoniu (VAM, Wiślica, PBD 6, TN 86, V.SCR) prowadzono w doświadczeniach polowych, w 13 krajach (Niemcy, Szwajcaria, Polska, Węgry, Francja, Macedonia, Włochy, Chorwacja, Chiny, Kolumbia, Iran, Zimbabwe i Korea Płd.) na znacznych arealach charakteryzujących się występowaniem PVY. Żadna z badanych odmian nie wykazała całkowitej odporności na występujące szczepy tego wirusa (rys. 1). Udział roślin porażonych wśród badanych odmian był zróżnicowany w poszczególnych latach, co na ogół odpowiadało nasileniu występowania wirusa. Największą odpornością charakteryzowały się niemiecka odmiana VAM i polska odmiana Wiślica. Stosunkowo dobrze w ocenie polowej wypadła odmiana TN 86, zawierająca taki sam typ odporności, jak odmiana VAM. Zdecydowanie większym udziałem roślin wykazujących nekrozy nerwów cechowały się odmiany PBD 6 i V.SCR.

W badaniach własnych odporności w warunkach szklarniowych uwzględniono odmiany VAM, Wiślica, PBD 6, dziki gatunek *N. africana* i podatną odmianę Samsun H. Do inokulacji użyto 17 izolatów należących do grupy PVY^{NW} oraz 12 izolatów należących do PVY^{NTN}. Wszystkie izolaty wykorzystane w tych badaniach pochodziły z Polski, z odmian i linii hodowlanych tytoniu. Izolat PVY^{NW} 1 pochodził z odmiany podatnej, pozostałe genotypy wykazywały określony stopień odporności na PVY. Odmiana VAM nie wykazywała objawów chorobowych po inokulacji izolatami PVY^{NW} 1, PVY^{NW} 12, PVY^{NW} 13, PVY^{NW} 14 i PVY^{NW} 16. Małe wartości absorbancji w teście ELISA potwierdziły odporność tej odmiany na wymienione izolaty. Przejaśnienia nerwów i obecność wirusa w soku dwóch z czterech zakażanych roślin były efektem porażenia izolatami PVY^{NW} 15. Po inokulacji pozostałymi 11 izolatami



Rys. 1. Ocena odporności odmian tytoniu na PVY w naturalnych warunkach polowych

Źródło: Opracowanie własne na podstawie badań w programie CORESTA Sub-Group Collaborative Study on PVY koordynowanego przez autorke.

z grupy PVY^{NW} odmiana VAM uległa porażeniu, wykazując nekrozy nerwów i dużą koncentrację wirusa w soku zakażanych roślin (tab. 1).

Odmiana Wiślica nie uległa porażeniu jedynie po zastosowaniu izolatu PVY^{NW} 1, pochodzącego z odmian podatnych oraz wykazała plamy chlorotyczne po zakażeniu izolatami PVY^{NW} 13. Na pozostałe izolaty odmiana Wiślica reagowała nekrozą nerwów. Jeszcze niższym stopniem odporności charakteryzowała się odmiana PBD 6, która nie uległa porażeniu tylko po inokulacji izolatami PVY^{NW} 1. Największą odpornością charakteryzował się gatunek *N. africana*, który nie wykazywał żadnych objawów chorobowych ani obecności wirusa w soku inokulowanych roślin. Odmiana kontrolna Samsun H uległa porażeniu wykazując silne objawy nekrotyczne i wysokie wartości absorbancji. Obecność wirusa w soku zakażonych roślin izolatami z grupy PVY^{NW} była wykrywalna tylko przy użyciu przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko wszystkim szczepom PVY; nie wykrywały tych izolatów przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko szczepom nekrotycznym, pomimo nekrotycznego charakteru wywoływanych przez te izolaty objawów (tab. 1). Powodem takiej reakcji jest fakt, iż izolaty należące do PVY^{NW} powstały na drodze rekombinacji ze szczepu zwykłego (0) i nekrotycznego (N); (16). Białko płaszczka (CP) pochodzi od szczepu zwykłego (nie nekrotycznego) natomiast informacja genetyczna zawarta w kwasach nukleinowych od szczepu nekrotycznego (12, 13).

Tabela 1

Porównanie odporności odmian tytoniu (Samsun H, VAM, Wislica, PBD6) i gatunku *N. africana* na izolaty PVY^{NW}

Izolaty PVY	Liczba roślin inokulowanych/porażonych															
	Samsun			VAM			Wislica			PBD6			<i>N. africana</i>			
	ELISA**		objawy*	ELISA**		objawy*	ELISA**		objawy*	ELISA**		objawy*	ELISA**			
	1	2		1	2		1	2		1	2					
PVY ^{NW} 1	VN	3/3	3/0	bo	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	bo	3/0	3/0
PVY ^{NW} 2	VN	3/3	3/0	VN	5/5	5/0	5/0	5/5	5/0	VN	5/5	5/0	5/0	bo	3/0	3/0
PVY ^{NW} 3	VN	3/3	3/0	VN	5/5	5/0	5/0	5/5	5/0	VN	5/5	5/0	5/0	bo	3/0	3/0
PVY ^{NW} 4	VN	3/3	3/0	VN	5/5	5/0	5/0	5/5	5/0	VN	5/5	5/0	5/0	bo	3/0	3/0
PVY ^{NW} 5	VN	3/3	3/0	VN	5/5	5/0	5/0	5/5	5/0	VN	5/5	5/0	5/0	bo	3/0	3/0
PVY ^{NW} 6	VN	3/3	3/0	VN	5/3	5/0	5/0	5/5	5/0	VN	5/5	5/0	5/0	bo	3/0	3/0
PVY ^{NW} 7	VN	3/3	3/0	VN	3/3	3/0	3/0	3/3	3/0	VN	3/3	3/0	3/0	bo	3/0	3/0
PVY ^{NW} 8	VN	3/3	3/0	VN	3/3	3/0	3/0	3/3	3/0	VN	3/3	3/0	3/0	bo	3/0	3/0
PVY ^{NW} 9	VN	3/3	3/0	VN	3/3	3/0	3/0	3/2	3/0	VN	3/3	3/0	3/0	bo	3/0	3/0
PVY ^{NW} 10	VN	3/3	3/0	VN	3/3	3/0	3/0	3/3	3/0	VN	3/3	3/0	3/0	bo	3/0	3/0
PVY ^{NW} 11	VN	3/3	3/0	VN	3/3	3/0	3/0	3/3	3/0	VN	3/3	3/0	3/0	bo	3/0	3/0
PVY ^{NW} 12	VN	3/3	3/0	bo	3/3	3/0	3/0	3/3	3/0	VN	3/3	3/0	3/0	bo	3/0	3/0
PVY ^{NW} 13	VN	3/3	3/0	bo	3/0	3/0	3/0	CS	3/1	3/0	3/0	5/5	5/0	bo	3/0	3/0
PVY ^{NW} 14	VN	3/3	3/0	bo	3/0	3/0	3/0	VN, CS	4/4	4/0	4/0	3/3	3/0	bo	3/0	3/0
PVY ^{NW} 15	VN	3/3	3/0	VC	4/2	4/0	4/0	VN	4/4	4/0	4/0	4/4	4/0	bo	3/0	3/0
PVY ^{NW} 16	VN	3/3	3/0	bo	4/0	4/0	4/0	VN	4/4	4/0	4/0	4/4	4/0	bo	3/0	3/0
PVY ^{NW} 17	VN	3/3	3/0	VN	4/4	4/0	4/0	VN	4/4	4/0	4/0	4/4	4/0	bo	3/0	3/0

* VN – nekroza nerwów, CS – plamy chlorotyczne, bo – bez objawów; PVY^{NW} 1 – PVY^{NW} 17 izolaty pochodzące z odmian i linii hodowlanych tytoniu

** ELISA 1 – przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko różnym szczepom PVY (MoAbs anti Y)

** ELISA 2 – przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko nekrotycznym szczepom PVY (MoAbs anti Y^N)

Źródło: Wyniki badań własnych.

Drugą grupę izolatów użytych w tych badaniach stanowiły PVY^{NTN}. Izolaty te wykrywalne są przez dwa rodzaje przeciwciał firmy Bioreba oraz wykazują zdolność wywoływania nekroz na bulwach ziemniaka (necrotic tuber necrosis); (14). Do inokulacji użyto 12 izolatów z tej grupy (tab. 2). Odmiana VAM nie uległa porażeniu tylko po inokulacji izolatami PVY^{NTN} 28 i PVY^{NTN} 30, zaś pozostałe izolaty wywoływały nekrozę nerwów i wysoką koncentrację wirusa w soku badanych roślin. Wiślica zareagowała przejaśnieniem nerwów na izolat PVY^{NTN} 28, a na pozostałe nekrozą nerwów. Najmniej odporna na izolaty z grupy NTN okazała się odmiana PBD 6, ulegając porażeniu przez wszystkie badane izolaty. Podobnie jak przy użyciu izolatów PVY^{NW} dziki gatunek *N. africana* nie uległ porażeniu żadnym z badanych izolatów.

Porównując użyte w badaniach odmiany tytoniu widać zróżnicowanie poszczególnych genotypów pod względem odporności na różne izolaty PVY. Spośród pięciu odmian uprawnych tytoniu wybranych w badaniach jako źródło odporności różniące się sposobem jej uzyskania, największą odpornością charakteryzowały się odmiany VAM i Wiślica. Wskazują na to wyniki z wieloletnich doświadczeń polowych prowadzonych w różnych krajach, o zróżnicowanej presji PVY, jak też wyniki inokulacji przy użyciu 29 izolatów. Odporność odmiany VAM warunkowana jest pojedynczym recesywnym genem określanym jako *va*, będącym delecją odcinka sekwencji odpowiedzialnego za podatność na PVY (21). To samo źródło odporności przeniesione do odmiany TN 86 jest nieco mniej skuteczne niż w odmianie wyjściowej. Odmiana V.SCR uzyskana w wyniku selekcji masowej (2) zawiera również gen określanym jako *va*, jednakże jest on mniej skuteczny w obronie przed silnymi izolatami (11, 22). B l a n c a r d i in. (1) wyróżnili trzy alleliczne formy genu *va* o różnym stopniu odporności: *va*⁰, *va*¹ i *va*². Według autorów najbardziej efektywna forma *va*⁰ obecna jest w genotypie VAM, a najsłabsza *va*² w genotypie V.SCR. Polska odmiana Wiślica wypada stosunkowo dobrze zarówno w polowych badaniach porównawczych, jak i podczas inokulacji. Dokładne pochodzenie tej odporności (obecnej również u wielu innych polskich odmian) nie jest udokumentowane, można natomiast wnosić, że jest to również typ odporności warunkowany delecją genu podatności. Pochodzenie odmiany PBD 6 określane jest jako wynik selekcji z krzyżówki odmian paragwajskiej i Bel 61-10 (22), natomiast odporność wykazana w badaniach polowych i inokulacjach była nieco mniejsza niż odmian VAM i Wiślicy. Badane odmiany wykazują wprawdzie zróżnicowany poziom odporności na PVY, jednakże żadna z nich nie jest efektywna w zetknięciu z nowymi izolatami należącymi do grupy PVY^{NTN} i niektórymi z grupy PVY^{NW}. Zatem ważnym aspektem jest ocena innych źródeł odporności.

Czynniki odporności na PVY pochodzące od gatunku *N. africana* zawierają linie BPA (9) oraz linie mieszańcowe WABPA 2 i WABPA 3 (dane własne niepublikowane). W badaniach odpornościowych porównano je z odmianą Wiślica i odmianą kontrolną Samsun H (tab. 3). Do inokulacji wybrano sześć izolatów spośród 29 zastosowanych w badaniach dotyczących oceny odporności odmian. Trzy z nich należą do grupy PVY^{NW} i trzy do grupy PVY^{NTN}. Izolaty te różnią się zdolnością infekcyjną w stosunku do poszczególnych odmian tytoniu (tab. 1 i 2).

Tabela 2
Porównanie odporności odmian tytoniu (Samsun H, VAM, Wiślica, PBD6) i gatunku *N. africana* na izolaty PVY^{NTN}

Izolaty PVY	Liczba roślin inokulowanych/zainfekowanych													
	Samsun H			VAM			Wiślica			PBD 6			<i>N. africana</i>	
	ELISA**		objawy*	ELISA**		objawy*	ELISA**		objawy*	ELISA**		objawy*	ELISA**	
	1	2		1	2		1	2		1	2		1	2
PVY ^{NTN} 20	VN	5/5	VN	5/5	VN	5/5	VN	5/5	VN	5/5	bo	3/0	3/0	
PVY ^{NTN} 21	VN	5/5	VN	5/5	VN	5/5	VN	5/5	VN	5/5	bo	3/0	3/0	
PVY ^{NTN} 22	VN	5/5	VN	5/5	VN	5/5	VN	5/5	VN	5/5	bo	3/0	3/0	
PVY ^{NTN} 23	VN	5/5	VN	5/5	VN	5/5	VN	5/5	VN	5/5	bo	3/0	3/0	
PVY ^{NTN} 24	VN	3/3	3/3	VN	3/3	3/3	VN	3/3	VN	3/3	bo	3/0	3/0	
PVY ^{NTN} 25	VN	3/3	3/3	VN	3/3	3/3	VN	3/3	VN	3/3	bo	3/0	3/0	
PVY ^{NTN} 26	VN	3/3	3/3	VN	3/2	3/2	VN	3/3	VN	3/3	bo	3/0	3/0	
PVY ^{NTN} 27	VN	3/3	3/3	VN	3/3	3/3	VN	3/3	VN	3/3	bo	3/0	3/0	
PVY ^{NTN} 28	VN	3/3	3/3	bo	3/0	CS	3/3	3/3	VN	3/3	bo	3/0	3/0	
PVY ^{NTN} 29	VN	3/3	3/3	VN	3/3	3/3	VN	3/3	VN	3/3	bo	3/0	3/0	
PVY ^{NTN} 30	VN	3/3	3/3	bo	3/0	VN	3/3	3/3	VN	3/3	bo	3/0	3/0	
PVY ^{NTN} 31	VN	3/3	3/3	VN	5/5	5/5	VN	5/5	VN	5/5	bo	3/0	3/0	

* VN – nekroza nerwów, CS – plamy chlorotyczne, bo – bez objawów; PVY^{NTN}20 – PVY^{NTN}31 izolaty pochodzące z odmian i linii hodowlanych tytoniu

** ELISA 1 – przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko różnym szczepom PVY (MoAbs anti Y)

** ELISA 2 – przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko nekrotycznym szczepom PVY (MoAbs anti Y^N)

Źródło: Wyniki badań własnych.

Tabela 3

Porównanie odporności linii hodowlanych tytoniu, odmiany Wiślica i odmiany kontrolnej Samsun H na wybrane izolaty PVY

Izolaty PVY	Liczba roślin inokulowanych/zainfekowanych														
	BPA		WABPA2		WABPA3		Wiślica		Samsun H						
	ELISA**		ELISA**		ELISA**		ELISA**		ELISA**						
	objawy*	1	2	objawy*	1	2	objawy*	1	2	objawy*	1	2			
PVY ^N W 1	16 bo, 4 CS	20/12	20/0	bo	10/0	10/0	bo	10/0	10/0	bo	10/0	10/0	VN	10/10	10/0
PVY ^N W 4	14 bo, 6 CS	20/16	20/0	bo	10/0	10/0	bo	10/0	10/0	VN	10/10	10/0	VN	10/10	10/0
PVY ^N W 13	VC, CS	20/10	20/0	bo	10/0	10/0	bo	10/0	10/0	CS	10/3	10/0	VN	10/10	10/0
PVY ^N IN 20	VC, CS	20/20	20/20	VN	10/10	10/10	VN	10/10	10/10	VN	10/10	10/10	VN	10/10	10/10
PVY ^N IN 21	VC, CS	20/20	20/20	VN	10/10	10/10	VN	10/10	10/10	VN	10/10	10/10	VN	10/10	10/10
PVY ^N IN 28	10 bo, 10CS	20/12	20/12	bo, CS	10/4	10/4	bo	10/0	10/0	VC	10/5	10/5	VN	10/10	10/10

* VN – nekroza nerwów, CS – plamy chlorotyczne, VC – przejaśnienia nerwów, bo – bez objawów

** ELISA 1 – przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko różnym szczepom PVY (MoAbs anti Y)

** ELISA 2 – przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko nekrotycznym szczepom PVY (MoAbs anti Y^N)

Źródło: Wyniki badań własnych.

W wyniku inokulacji linii BPA izolatem PVY^{NW} 1 cztery rośliny wykazywały plamy chlorotyczne, a u 12 z 20 badanych roślin wirus był wykrywalny metodą serologiczną (tab. 3). Linie WAPBA 2 i WABPA 3 oraz odmiana Wiślica nie uległy porażeniu tym izolatem. Zastosowanie izolatu PVY^{NW} 4, który w poprzednich badaniach przełamał odporność wszystkich badanych odmian (tab. 1), spowodowało podobne objawy u linii BPA, jak zastosowanie izolatu PVY^{NW} 1, natomiast nie uległy porażeniu linie WABPA 2 i WABPA 3. Wszystkie rośliny odmiany Wiślica wykazały nekrozę nerwów po inokulacji tym izolatem (tab. 3). Podobnie reagowały rośliny linii BPA, WABPA 2 i WABPA 3 na zakażenie izolatem PVY^{NW} 13; odmiana Wiślica wykazywała również tylko plamy chlorotyczne. Izolaty z grupy NTN (PVY^{NTN20} i PVY^{NTN21}) spowodowały przejaśnienia nerwów i plamy chlorotyczne na wszystkich roślinach BPA, nie wywołały jednak nekrozy nerwów, jak miało to miejsce w przypadku pozostałych linii hodowlanych i odmiany Wiślica. Reakcja na inokulację słabszym izolatem PVY^{NTN28} była podobna, jak na dwa izolaty z grupy PVY^{NW}.

Linia BPA ulegająca wprawdzie infekcji po zakażeniu słabszymi izolatami reagowała tylko objawami chlorotycznymi również w zetknięciu z izolatami wywołującymi objawy nekrotyczne na odmianach uznawanych dotychczas za odporne. W porównaniu z gatunkiem *N. africana*, będącym rodzicem ojcowskim w wyjściowym mieszańcu, od którego pochodzi linia BPA (10), widać wyraźnie, że odporność linii hodowlanej nie jest tak wysoka, jak gatunku dzikiego. Powodem tego jest najprawdopodobniej niekompletny transfer czynników odporności będący kompromisem pomiędzy odpornością a cechami użytkowymi, ważnymi z gospodarczego punktu widzenia. Przeniesienie odporności od *N. africana* nastąpiło prawdopodobnie w wyniku substytucji segmentalnej dotyczącej małego odcinka chromosomu, nie obejmującego wszystkich genów warunkujących kompletną odporność. Innym powodem niekompletnej odporności linii BPA może być niekorzystny wpływ genów z genomu *N. tabacum* obniżający ekspresję cechy odporności (10, 19). Linia BPA, będąca też przedmiotem badań w doświadczeniach polowych o różnej presji PVY, nigdy nie wykazała w Polsce i na Węgrzech objawów nekrotycznych. Linia ta reagowała podobnie na inokulację tytoniowymi izolatami zagranicznymi, jak też po inokulacji izolatami pochodzącymi z ziemniaka (9). Na podstawie przeprowadzonych badań odporność linii BPA należy określić jako tolerancję wobec różnych szczepów PVY.

Linia WABPA 3 wypadła w tej ocenie korzystniej niż odmiana Wiślica, a przy porównaniu skuteczności izolatu PVY^{NW} 4 lepiej niż VAM i PBD 6, lecz uległa porażeniu przez dwa najbardziej wirulentne izolaty z grupy NTN. Prowadzone są dalsze badania nad selekcją linii o wyższym stopniu odporności i podejmowane próby określenia mechanizmów warunkujących tę odporność.

Inną grupę roślin stanowiących potencjalne źródło odporności tytoniu są rośliny transgeniczne. W wyniku transformacji odmian podatnych na PVY (Mac Nair 944, K326, BY 103, AC Gayed) przy użyciu trzech konstrukcji: LMV CP, pROKY1 i pROKY2 uzyskano linie transgeniczne (8, 9). Testy odpornościowe wszystkich roślin transgenicznych należących do pokoleń T₂ i T₃ poprzedzono badaniami potwier-

Tabela 4

Odporność linii transgenicznych pokoleń T₂ i T₃ na izolaty PVY

Linia*	Rośliny odporne na PVY (%)**		
	PVY ^{NW} 1	PVY ^{NTN} 20	PVY ^{NTN} 21
MN 944 LMV CP	86	80,3	51,5
K 326 LMV CP	9,1	10,9	15,6
BY 103 LMV CP	65,5	66	41,1
Średnio LMV CP	53,5	52,4	36,1
MN 944 ROKY1	0	0	0
K 326 ROKY1	35,3	5,8	9,5
BY 103 ROKY1	0	8,3	0
AC Gayed ROKY1	44,2	62,2	53,6
Średnio ROKY1	19,9	19,1	15,7
K 326 ROKY2	42,2	34,7	31,5
BY 103 ROKY2	40,7	22,5	10
AC Gayed ROKY2	100	80	71,4
Średnio ROKY2	61	45,7	37,6

* MV CP, ROKY1, ROKY2 – konstrukcje obecne w liniach transgenicznych

** PVY^{NW} 1, PVY^{NTN}20, PVY^{NTN}21 – izolaty pochodzące z odmian i linii hodowlanych tytoniu

Źródło: Czubačka A., 2005 (6).

dzającymi obecność transgeny, a następnie po około 20 roślin z każdej linii poddano inokulacji przy użyciu izolatów: PVY^{NW} 1, PVY^{NTN} 20 i PVY^{NTN}21 (6); (tab. 4).

Biorąc pod uwagę użyte konstrukcje najskuteczniejszą ochronę przed trzema izolatami PVY stanowiły transgeny LMV CP i ROKY2. Mniejszą liczbę roślin odpornych zanotowano wśród transformowanych konstrukcją ROKY1. Rozpatrując aspekt odmianowy zdecydowanie najwięcej roślin odpornych stwierdzono wśród transgenicznych linii AC Gayed i MN 944, mniej w obrębie odmiany BY 103. Najmniej efektywną ochroną przed PVY charakteryzowała się odmiana K 326. Natomiast linia AC Gayed ROKY2 wykazywała dużą odporność na trzy izolaty wirusa Y ziemniaka, gdzie 71,4-100% należących do niej roślin było odpornych na brunatną nekrozę nerwów liści tytoniu.

Celem weryfikacji stabilności cechy odporności podjęto badania nad kolejnymi pokoleniami linii transgenicznych, charakteryzującymi się największą odpornością na PVY w poprzednich badaniach (tab. 4).

Do dalszych prac wytypowano dwie linie – MN 944 zawierającą konstrukcją LMV CP i AC Gayed niosącą konstrukcję ROKY2. Do badań odpornościowych użyto trzy izolaty: PVY^{NTN} 32, PVY^{NW} 18 i PVY^{NW} 19 pozyskane w warunkach polowych z odpornych odmian tytoniu (tab. 5). Linia transgeniczna MN 944 LMV CP okazała się odporna na wszystkie użyte izolaty, podczas gdy linia AC Gayed niosąca transgen ROKY2 uległa porażeniu wykazując nekrozy nerwów. Obniżenie stopnia odporności roślin z linii AC Gayed ROKY2 w stosunku do pokolenia poprzedniego mogło być spowodowane wzrostem metylacji transgeny, która może skutkować jego inaktywacją.

Tabela 5

Odporność wybranych linii transgeniczných pokolenia T4 na izolaty PVY

Izolaty PVY	Liczba roślin inokulowanych/Liczba roślin porażonych								
	MN 944 LMV CP			AC Gayed ROKY2			Samsun H		
	objawy*	ELISA**		objawy*	ELISA**		objawy*	ELISA**	
		1	2		1	2		1	2
PVY ^{N^N} 32	b.o.	5/0	5/0	NV	4/4	4/4	NV	2/2	2/2
PVY ^{N^W} 18	b.o.	5/0	5/0	NV	3/2	3/0	NV, VC	2/2	2/0
PVY ^{N^W} 19	b.o.	1/0	1/0	NV, CS	5/2	5/0	NV	2/2	2/0

* VN – nekroza nerwów, CS – plamy chlorotyczne, VC – przejaśnienia nerwów, bo – bez objawów

** ELISA 1 – przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko różnym szczepom PVY (MoAbs anti Y)

** ELISA 2 – przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko nekrotyczným szczepom PVY (MoAbs anti Y^N)

Źródło: Wyniki badań własnych.

Zjawisko takie obserwowano w przypadku transgenicznego ryżu (18). Stan inaktywacji transgenu jest często dziedziczny, a jego metylacja może rosnać w kolejnych pokoleniach.

Podsumowanie

Przeprowadzone badania wykazują zróżnicowanie odporności na PVY wśród badanych odmian i linii hodowlanych tytoniu. Dotyczy ono różnych źródeł pochodzenia odporności, mechanizmów jej funkcjonowania i przede wszystkim reakcji w zetknięciu z nowymi izolatami. Prowadzone są prace nad możliwością połączenia dostępnych źródeł odporności w celu uzyskania genotypów o kompleksowej odporności na występujące obecnie szczepy i izolaty PVY. Pozytywne efekty łączenia dwóch źródeł odporności zaobserwowali Xu i in. (24). Skrzyżowanie tytoniu zawierającego transgen białka płaszczki wirusa TVMV (*Tobacco vein mottling virus*) z nietransgeniczným, ale zawierającym endogenny gen odporności VAM (ang. Virgin A Mutant) pozwoliło na podniesienie odporności przeciw potywirusom (wirusom Y ziemniaka) i rozszerzenie jej spectrum. Wstępne wyniki badań własnych wskazują również na możliwość efektywnego połączenia różnych źródeł odporności na PVY w jednym genomie.

Literatura

1. Blancard D., Ano G., Cailleteau B.: Etude du pouvoir pathogène d'isolates de PVY sur tabac: proposition d'une classification intégrant la résistance a la nécrose. Ann. Tabac, 1995, **27**: 43-50.
2. Carsten H., Seehofer F.: How Virginia SCR is obtained and cultivated in Federal Republic of Germany. CORESTA, 1960, **3**: 39-43.
3. Chachulska A.M., Chrzanowska M., Flis B., Krzymowska M., Lipska-Dwuznik A., Robaglia C., Zagórski W.: Potato and Tobacco cultivars transformation towards potato virus Y resistance. Biotechnologia, 1997, **4(39)**: 48-54.

4. Chrzanowska M., Doroszevska T.: Comparison between PVY isolates obtained from potato and tobacco plants in Poland. *Phytopathol. Pol.*, 1997, **13**: 63-71.
5. Clark M. F., Adams A. N.: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. *J. Gen. Virol.*, 1977, **34**: 475-483.
6. Czubačka A.: Badania odporności roślin transgenicznych tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) na wirusa Y ziemniaka (PVY) i ocena ich cech użytkowych. Praca doktorska, IUNG Puławy, 2000.
7. Dinant S., Maisonneuve B., Albouy J., Chupeau Y., Chupeau M. C., Bellec Y., Gaudefroy F., Kusiak C., Souche S., Robaglia C., Lot H.: Coat protein gene-mediated protection in *Lactuca sativa* against lettuce mosaic potyvirus strains. *Mol. Breed.*, 1997, **3(1)**: 75-86.
8. Doroszevska T., Chachulska A. M.: Możliwości uzyskiwania odporności na choroby wirusowe tytoniu. *Biotechnologia*, 2000, **4(51)**: 128-141.
9. Doroszevska T.: Krzyżowanie oddalone i transformacja genetyczna w uzyskiwaniu odporności tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) na wirusa Y ziemniaka. *Monogr. Rozpr. Nauk.*, IUNG Puławy, 2004, **6**.
10. Doroszevska T.: Uzyskanie stabilnych linii hodowlanych tytoniu z czynnikami odporności na różne izolaty wirusa Y ziemniaka (PVY) od dzikiego gatunku *Nicotiana africana* Merxm. *Biul. IHAR*, 2007, **244**: 273-287.
11. Doroszevska T., Verrier J. L.: Sub-Group Collaborative Study on Potato Virus Y. Annual Subgroup Report 2004, CORESTA CD-ROM Version N°20.
12. Glais L., Tribodet M., Gauthier J. P., Astier-Manifacer S., Robaglia C., Kerlan C.: RLFP mapping of the whole genome of ten viral isolates representative of the different biological groups of *Potato Virus Y*. *Arch. Virol.*, 1998, **143**: 2077-2091.
13. Glais L., Tribodet M., Kerlan C.: Genomic variability in Potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY⁰ and PVY^N isolates. *Arch. Virol.*, 2002, **147**: 363-378.
14. Golnik K., Syller J., Chrzanowska M., Sztangret-Wiśniewska J.: Metody identyfikacji szczepów wirusa Y ziemniaka. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Rośl.*, 2007, **47**: 94-96.
15. Guggerli P., Fries P.: Characterization of monoclonal antibodies to potato virus Y and their use for virus detection. *J. Gen. Virol.*, 1983, **64**: 2471-2477.
16. Kerlan C., Chrzanowska M., Glais L., Fremondiere G., Tribodet M.: Biological and molecular characterization of various PVY^{NW} isolates. 11th EAPR Virol. Sec. Meet., Trest, Czech Republic, 2001, 1-3.
17. Koelle G.: Genetische Analyse einer Y-virus (Rippen-braune) resistenten Mutante der Tabak-sorten Virgin A. *Der Zuchter*, 1961, **31**: 71-72.
18. Kumpatla S. P., Hall T. C.: Recurrent onset of epigenetic silencing in rice harboring a multi-copy transgene. *Plant J.*, 1998, **14(1)**: 129-135.
19. Lewis R. S.: Transfer of resistance to potato virus Y (PVY) from *Nicotiana africana* to *Nicotiana tabacum*: possible influence of tissue culture on the rate of introgression. *Theor. Appl. Genet.* 2005, **110**: 678-687.
20. Lucas G. B., Gooding G. V., Sasser J. N., Gerstel D. U.: Reaction of *Nicotiana africana* to black shank, Granville wilt, tobacco mosaic virus and potato virus Y. *Tob. Sci.*, 1980, **24**: 141-142.
21. Noguchi S., Tajima T., Yamamoto Y., Kubo T.: Identification of RAPD markers linked to potato virus Y resistance gene in tobacco. *Inf. Bull. CORESTA Yokohama*, 1996, 9.
22. Verrier J. L.: PVY Collaborative Experiment. Results 2001. Altadis, Institut du Tabac, Bergerac, France.
23. Voelk J.: Transmission de la souche du virus Y responsable de la maladie des cotes brunes. Deuxieme Congres Scientifique International du Tabac, Bruksela, 1958, 150-155.
24. Xu D., Collins G. B., Hunt A. G., Nielsen M. T.: Combining a host gene and tobacco vein mottling virus coat protein gene for broad and effective resistance to potyviruses in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Mol. Breed.*, 1997, **3(4)**: 331-339.

Adres do korespondencji:

doc. dr hab. Teresa Doroszevska
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin
IUNG-PIB
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy
tel.: 081 886 34 21 w. 216
e-mail: dorter@iung.pulawy.pl