TERESA DOROSZEWSKA
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa — Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

Uzyskanie stabilnych linii hodowlanych tytoniu z czynnikami odporności na różne izolaty wirusa Y ziemniaka (PVY) od dzikiego gatunku *Nicotiana africana* Merxm.

Obtaining of stable tobacco breeding lines with resistance factors to different PVY isolates from the wild species *Nicotiana africana* Merxm.

Badania nad przeniesieniem odporności na wirus Y ziemniaka (*Potato virus Y*, PVY) z dzikiego gatunku *Nicotiana africana* Merxm do tytoniu uprawnego prowadzono w pokoleniach BC_2 – BC_2F_6. Badania cytologiczne obejmowały ustalenie liczby chromosomów mitotycznych, obserwacje konfiguracji mejotycznych i badanie żywotności pyłku w kolejnych pokoleniach mieszańcowych. Obserwowano zmienną liczbę chromosomów mitotycznych w poszczególnych pokoleniach. Wraz z eliminacją chromosomów pochodzących z *N. africana* następował wzrost żywotności pyłku. Stabilne 48-chromosomowe linie stwierdzono w pokoleniu BC_2F_4. W badaniach odpornościowych prowadzonych w warunkach szklarniowych, przy użyciu bardzo wirulentnego szczepu Y^{NZ} obserwowano wzrost udziału roślin odpornych w kolejnych pokoleniach BC_2, BC_2F_1 i BC_2F_2. W wyniku selekcji prowadzonej w obrębie dalszych pokoleń BC_2F_3–BC_2F_6 w kierunku odporności na Y^N w warunkach naturalnej infekcji polowej, wyodrębniono linie (BPA) odporne bądź tolerancyjne na występujące izolaty wirusa Y ziemniaka. Inokulacja stabilnych linii BPA, przy użyciu sześciu izolatów należących do różnych szczepów nie wywołały objawów nekrotycznych, natomiast część roślin wykazywała przejaśnienia nerwów i wirus był wykrywany metodą serologiczną. Przeprowadzone badania odpornościowe uzyskanych linii hodowlanych wykazały, że ich odporność jest wyższa niż odmian uprawnych *N. tabacum*, co przejawia się brakiem reakcji nekrotycznych na roślinie, natomiast nieco niższa niż użytego do transferu odporności gatunku *N. africana*. Jednakże w sytuacji coraz częstszych infekcji, przejawiających się objawami nekrotycznymi odmian w obrębie *N. tabacum*, uzyskane linie stanowią cenny materiał hodowlany.

Słowa kluczowe: izolaty, krzyżowanie, *Nicotiana africana*, odporność, tytoń, wirus Y ziemniaka

The investigations on the transfer of *Potato virus Y* (PVY) resistance from the wild species *Nicotiana africana* Merxm. to cultivated tobacco were conducted in the BC_2–BC_2F_6 generation. Cytological investigations covered counts of mitotic chromosomes, meiotic configurations and pollen viability in the successive hybrid generations. A number of mitotic chromosomes varied in the generations studied. As *N. africana* chromosomes were eliminated, there was increase in the pollen viability. Stable 48-chromosome lines were found in the BC_2F_4 generation. In the resistance studies using a very virulent strain Y^{NZ} the increase in the percentage of resistant plants with each of the

advancing generations BC_2, BC_2F_1 and BC_2F_2 was observed. As the result of selection for resistance to PVY, carried out in further generations BC_2F_3 – BC_2F_6 in the conditions of natural field infection, breeding lines expressing the resistance to or tolerance of the occurring PVY isolates were selected. Plants of the BPA line inoculated using six different isolates representing different strains failed to develop necrotic symptoms, but some of them showed vein clearing, and virus was detected by serological methods. Resistance ratings of the breeding lines appeared to be higher than those of *N. tabacum* cultivars, as it was seen in the absence of necrotic reaction. However, they were lower than that in the *N. africana* donor species. Since infection pressure of the isolates producing necrotic symptoms in *N. tabacum* is currently relatively high, the stable breeding lines that carry *N. africana*-derived resistance factors to various PVY strains/isolates, are the source of a very valuable germplasm to be used in breeding.

Key words: hybridization, isolates, *Nicotiana africana*, resistance, tobacco, *Potato virus Y*

WSTĘP

Nekrotyczne szczepy PVY^N powodują brunatną nekrozę nerwów liści tytoniu, chorobę o bardzo dużym znaczeniu ekonomicznym dla uprawy i przemysłu tytoniowego w świecie (Lucas, 1975; Delon i in., 1993). Nekroza nerwów hamuje transport wody i soli mineralnych do tkanek liści, zaś nekroza blaszki liściowej ogranicza powierzchnię i zdolność asymilacyjną oraz wymianę gazową, a tym samym wzrost roślin (Wen i in., 1999). Obecność wirusa Y wpływa też niekorzystnie na szlaki metaboliczne, prowadząc do wzrostu zawartości azotanów w liściach (Verrier i in., 2001).

Hodowla odmian odpornych tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) [2n = 48] jest ograniczona wąskim zakresem źródeł odporności. Istniejąca obecnie odporność na PVY wśród większości odmian uprawnych warunkowana jest pojedynczym recesywnym genem *va* uzyskanym w wyniku działania promieni X na odmianę Virgin A Mutant (Koelle, 1961) oraz jej formy alleliczne (Wernsman, 1992; Ano i in., 1995). Jak wykazały badania Noguchi i wsp. (1999) odporność ta warunkowana jest delecją genu odpowiedzialnego za podatność odmian. Podobny mechanizm odporności obecny jest w wielu polskich odmianach tytoniu; przykładem jest powszechnie uprawiana odmiana Wiślica, stosowana też w badaniach jako odmiana testowa, różnicująca poszczególne izolaty (Chrzanowska i Doroszewska, 2004). Odporność obecna w odmianach polskich i zagranicznych nie jest jednak efektywna w zetknięciu z nowymi izolatami wirusa Y ziemniaka występującymi w wielu krajach świata (Doroszewska i Verrier, 2004). W 1994 roku stwierdzono na tytoniu w Polsce izolaty z grupy Y^{NTN} (Chrzanowska i in. 2002). Ich udział wzrasta w ostatnich latach także w wielu krajach Europy (Doroszewska i Verrier, 2004; Chrzanowska i in., 2002). Większość izolatów z grupy Y^{NTN} wykazuje zdolność przełamywania głównych źródeł odporności istniejących w obrębie *N. tabacum*, w tym odmiany VAM i polskich odmian uznawanych dotychczas za odporne. Ponadto stwierdzono obecność izolatów z grupy Y^NW również przełamujących odporność odmian uprawnych (Doroszewska i Verrier, 2004). Głównym źródłem infekcji tytoniu przez PVY są ziemniaki. Prowadzone wieloletnie badania we współpracy z IHAR — Oddział w Młochowie wykazały, że te same izolaty zdolne są do zakażania ziemniaka i tytoniu (Chrzanowska i Doroszewska, 1997; Chrzanowska i in., 2002).

Gatunkiem o wysokim stopniu odporności na PVY okazał się *N. africana* Merxm. [2n = 46] (Lucas i in., 1980). Przeprowadzone badania odpornościowe *N. africana* z wykorzystaniem wysoce wirulentnych izolatów PVY pochodzących z tytoniu i z ziemniaka potwierdziły wysoką odporność (zwaną immunią) tego gatunku (Doroszewska, 2002; Doroszewska i Verrier, 2004). Badania nad transferem czynników odporności były możliwe, dzięki pomyślnemu skrzyżowaniu podatnej na PVY odmiany tytoniu uprawnego cv. BP-210 [2n = 48] z *N. africana* oraz uzyskaniu żywotnych form mieszańcowych F_1 [2n = 47] na drodze kultury liścieni w warunkach *in vitro* (Doroszewska i Berbeć, 1996; Doroszewska, 1994) i przywróceniu płodności przez podwojenie liczby chromosomów. Płodne amfidiploidy [2n = 94] skrzyżowano wstecznie z tytoniem uzyskując pokolenie seskwidiploidalne [2n = 71] (Doroszewska i Berbeć, 2000).

Głównym celem prezentowanych badań było otrzymanie stabilnych linii hodowlanych i ocena ich odporności przy użyciu najważniejszych gospodarczo izolatów PVY. Z uwagi na fakt, że pozytywne efekty introgresji cechy odporności od odległego gatunku często obniżają wartość gospodarczą tytoniu, prace nad przeniesieniem odporności prowadzono w oparciu o systematyczne testowanie kolejnych pokoleń przy użyciu różnych szczepów PVY, z jednoczesną selekcją form najbardziej zbliżonych do odmiany uprawnej.

MATERIAŁ I METODY

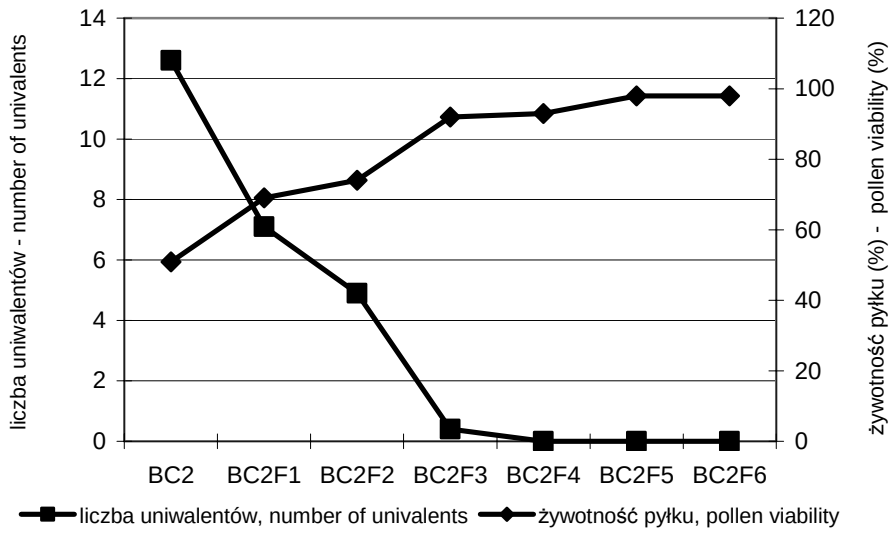
Materiałem wyjściowym w badaniach nad przeniesieniem odporności na PVY z dzikiego gatunku *N. africana* do tytoniu uprawnego było pokolenie poseskwidiploidalne (BC_2), uzyskane w wyniku krzyżowania wstecznego formy seskwidiploidalnej z tytoniem uprawnym odmiany BP-210: [(*N. tab*. cv. BP-210 × *N. africana*) × *N. tab*. cv. BP-210] × *N. tab*. cv. BP-210. W badaniach uwzględniono następujące pokolenia: BC_2F_1 — potomstwo pokolenia BC_2 uzyskane z samozapylenia; BC_2F_2–BC_2F_6 — potomstwo kolejnych pokoleń uzyskanych w wyniku samozapylenia; linie BPA — stabilne linie hodowlane będące potomstwem kolejnych pokoleń, wyprowadzonych z pokolenia BC_2F_6. Analizy cytogenetyczne obejmowały ustalenie liczby chromosomów mitotycznych (Burns, 1964), oraz konfiguracje mejotyczne w komórkach macierzystych pyłku (Burns, 1982). Badania roślin mieszańcowych pokolenia BC_2, BC_2F_1, BC_1F_2 prowadzono w doświadczeniach szklarniowych w kierunku odporności na Y^{NZ}, jeden z bardziej agresywnych szczepów PVY (Gajos, 1971; Doroszewska, 2002). Inokulacje prowadzono w stadium 5–6 liści. Pokolenia BC_2F_3 –BC_2F_6 oraz linie BPA badano w doświadczeniach polowych o charakterze szkółki hodowlanej, po ok. 50 roślin na poletku. Obserwowano stan odporności roślin na PVY w warunkach naturalnej infekcji polowej. Ponadto przeprowadzono inokulację linii BPA w fitotronie, w kontrolowanych warunkach temperatury i długości dnia, przy użyciu następujących izolatów PVY pochodzących z tytoniu: Y^NW1 — pozyskany w Polsce, nie przełamuje odporności VAM i Wiślicy; Y^NW2 — pozyskany w Polsce, nie przełamuje odporności VAM; Y^NW3 — pozyskany w Polsce, przełamuje odporność VAM i Wiślicy; $Y^{NTN}PL$ — pozyskany w Polsce, przełamuje odporność VAM i Wiślicy; $Y^{NTN}Ge$ — pozyskany z Niemiec, przełamuje

odporność VAM i Wiślicy; Y^{NTN}Fr — pozyskany z Francji, przełamuje odporność VAM i Wiślicy. Testowano po 20 roślin linii BPA oraz po 10 roślin odmian uprawnych i dzikiego gatunku *N. africana*, każdym z izolatów.

Zainfekowanie roślin inokulowanych jak również pochodzących z doświadczeń polowych stwierdzano testem DAS-ELISA (Double-Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay), używając przeciwciał monoklonalnych, skierowanych przeciwko różnym szczepom wirusa Y (MoAbs anti Y) — IgG112911, określanych jako ELISA*1, oraz skierowanych przeciwko szczepom nekrotycznym tego wirusa (MoAbs anti Y^N) — IgG112712, określanych jako ELISA**2, produkowanych przez firmę Bioreba (Gugerli i Fries, 1983). Za zdrowe uznawano rośliny bez objawów chorobowych o wartościach absorbancji poniżej 0,1.

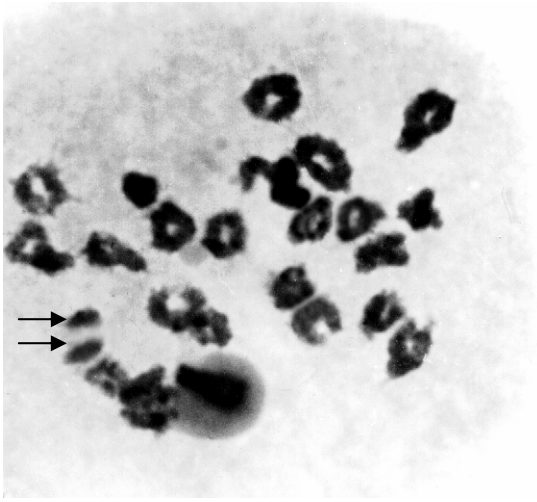
WYNIKI

W kolejnych pokoleniach roślin mieszańcowych BC_2–BC_2F_4 obserwowano stopniową eliminację chromosomów pochodzących od dzikiego gatunku *N. africana*. Wraz ze spadkiem liczby uniwalentów następował wzrost żywotności pyłku (rys. 1).



Rys. 1. Frekwencja uniwalentów i żywotność pyłku w pokoleniach BC_2–BC_2F_6
Fig. 1. Univalent frequency and pollen viability in the BC_2–BC_2F_6 generation

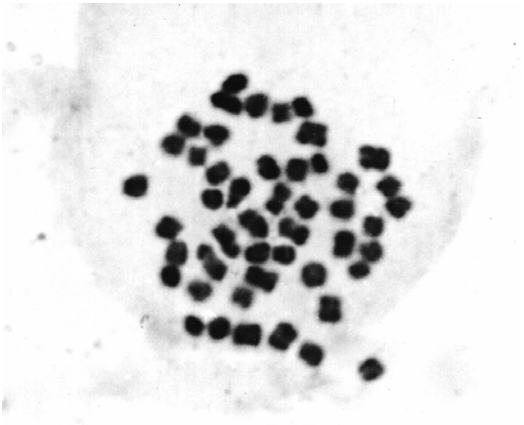
Wzrost homozygotyczności roślin obserwowano w pokoleniu BC_2F_3, gdzie większość roślin zawierała 48 chromosomów w komórkach somatycznych; tylko niektóre rośliny zawierały 50 chromosomów. W diakinezie i metafazie I komórek macierzystych pyłku roślin 50-chromosomowych widoczne były dwa uniwalenty (rys. 2), które pozostawały jako chromosomy opóźnione w dalszych stadiach mejozy.



→ uniwalent, univalent

Rys. 2. Diakineza roślin pokolenia BC_2F_3 24 biwalenty i 2 uniwalenty
Fig.2. Diakinesis of BC_2F_3 generation, 24 bivalents and 2 univalents

Stabilne linie stwierdzono w pokoleniu BC_2F_4; wszystkie badane rośliny miały po 48 chromosomów w komórkach somatycznych (rys. 3). Przebieg mejozy był bardzo regularny, w diakinezie (rys. 4 a) i metafazie I (rys. 4 b) komórek wszystkich badanych roślin obserwowano 24 biwalenty oraz po 24 chromosomy w metafazie II (rys. 4 c).

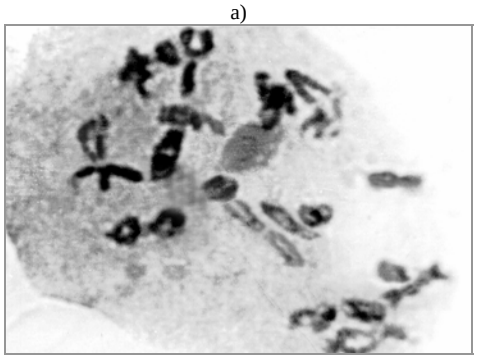


Rys. 3. Chromosomy mitotyczne roślin pokolenia BC_2F_4 (48 chromosomów)
Fig. 3. Mitotic chromosomes of the BC_2F_4 generations (48 chromosomes)

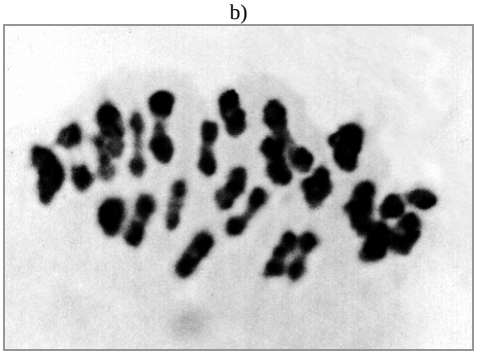
W wyniku inokulacji 160 roślin pokolenia BC_2 szczepem PVY^{NZ}, 108 roślin uległo porażeniu, wykazując nekrozy nerwów oraz chlorotyczne i nekrotyczne plamy na blaszce liściowej. Pozostałe, bezobjawowe 52 rośliny poddano testom ELISA z udziałem dwóch rodzajów przeciwciał. Wśród roślin bezobjawowych, testy ELISA wykazały obecność

wirusa w dziesięciu roślinach przy użyciu obydwu rodzajów przeciwciał. Rośliny odporne w tym pokoleniu stanowiły 26,3% (rys. 5).

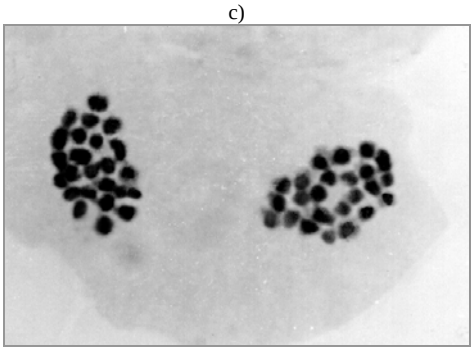
a)



b)



c)

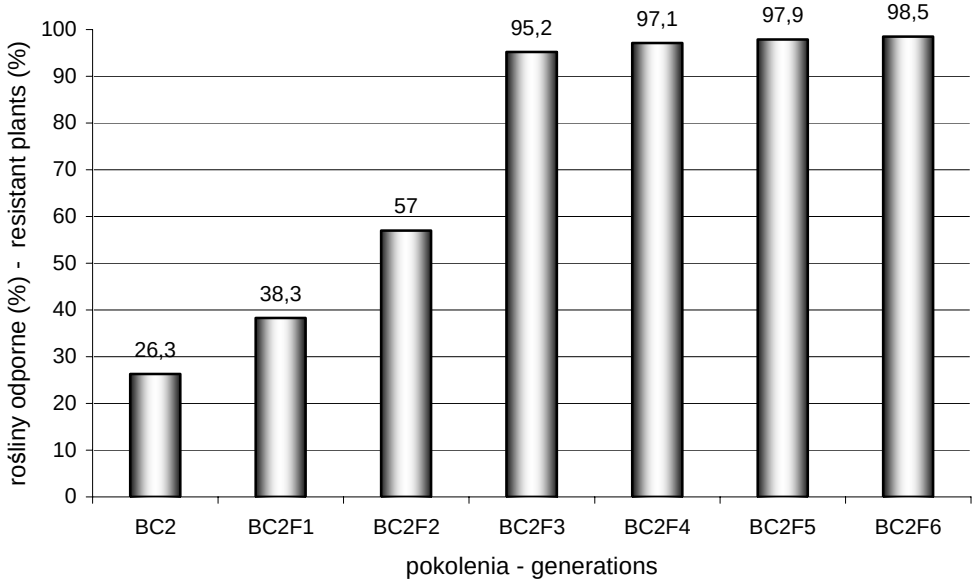


a) diakineza, 24 biwalenty; Diakinesis, 24 bivalents
b) późna metafaza I, 24 biwalenty; later Metaphase I, 24 bivalents
c) metafaza II, 24-chromosomowe diady; Metaphase II, dyads with 24 chromosomes

Rys. 4. Konfiguracje mejotyczne roślin pokolenia BC_2F_4
Fig. 4. Meiotic configuration of the BC_2F_4 generations

W pokoleniu BC_2F_1, badano 360 roślin będących potomstwem uzyskanym z samozapylenia 36 roślin odpornych pokolenia BC_2. Po inokulacji szczepem PVY^{NZ} 150 roślin wykazywało nekrozy nerwów, zaś wśród 210 roślin bezobjawowych — 72 wykazywały podwyższoną wartość absorbancji. Negatywny wynik testu ELISA świadczący

o odporności charakteryzował 138 roślin. Procent roślin odpornych w tym pokoleniu był wyższy niż w BC_2 i wynosił 38,3% (rys. 5). Metodą selekcji uwzględniającej cechę odporności oraz cechy fenotypowe, wyodrębniono 20 roślin, których potomstwo przeznaczono do dalszych badań nad transferem cechy odporności na PVY.



pokolenia BC_2 - BC_2F_2 – inokulowano szczepem Y^{NZ}; pokolenia BC_2F_3 - BC_2F_6 badano w warunkach naturalnej infekcji polowej PVY^N
BC_2 - BC_2F_2 generations were inoculated with Y^{NZ}; BC_2F_3 - BC_2F_6 generations were investigated under the natural field infection with PVY^N

Rys. 5. Udział roślin odpornych na PVY^N w pokoleniach BC_2-BC_2F_6
Fig. 5. Percentage of plants resistant to PVY^N in the BC_2-BC_2F_6 generation

Inokulację roślin pokolenia BC_2F_2 prowadzono na 200 roślinach będących potomstwem wyselekcjonowanych 20 roślin pokolenia BC_2F_1. Zainfekowaniu uległo 66 roślin, a wśród 134 pozostałych, negatywny wynik testu ELISA wykazało 114 roślin, co stanowiło 57% ogółu zakażanych roślin. Odmiana *N. tabacum* BP-210 będąca formą mateczną w wyjściowym mieszańcu ulegała porażeniu w 100% podczas wszystkich inokulacji, wykazując silną nekrozę nerwów. Nie zostały natomiast zainfekowane rośliny gatunku dzikiego *N. africana* użytego jako forma ojcowska w krzyżowaniu międzygatunkowym. We wszystkich pokoleniach, do zbioru wybierano rośliny najbardziej utrzymujące się w typie odmiany BP-210 (pokrój rośliny, kształt i liczba liści, budowa kwiatu), uwzględniając jednocześnie charakter odpornościowy poszczególnych badanych populacji.

W pokoleniu BC_2F_3 uwzględniono 20 linii wyselekcjonowanych z poprzedniego pokolenia. Badania prowadzono w doświadczeniu polowym, w warunkach silnej presji wirusa PVY^N, na poletkach liczących około 50 roślin. Objawy wywołane przez ten

szczep wystąpiły na pojedynczych roślinach dziewięciu badanych linii, wśród pozostałych 11 linii rośliny nie wykazywały objawów nekrotycznych. Testy ELISA wykonane w obrębie 990 roślin bezobjawowych wykazały obecność wirusa w 48 roślinach, w większości na poletkach z obserwowanymi objawami nekrotycznymi oraz na trzech poletkach z roślinami niewykazującymi nekrozy. Pozostałych osiem linii charakteryzowało się odpornością na Y^N w warunkach naturalnej infekcji polowej. W obrębie wszystkich badanych linii pokolenia BC_2F_3, rośliny odporne stanowiły 95,2% (rys. 5). Odmiana uprawna BP-210 uległa porażeniu w tym doświadczeniu w 86%. Obecność wirusa w roślinach z nekrozami nerwów, jak też w bezobjawowych, bądź wykazujących słabe przejaśnienia nerwów była wykrywalna tylko przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko wszystkim szczepom; natomiast nie wykrywały wirusa przeciwciała skierowane przeciwko szczepowi Y^N (MoAbs antiY^N).

Potomstwo ośmiu linii z pokolenia BC_2F_3 odpornych na PVY^N było przedmiotem badań w warunkach naturalnej infekcji polowej. Wśród roślin tego pokolenia nie obserwowano nekrozy nerwów, jedynie chlorotyczne plamy na trzech roślinach. Testy ELISA wykazały obecność wirusa u 11 roślin należących do trzech linii badanego pokolenia BC_2F_4, zaś wśród pozostałych pięciu linii nie stwierdzono obecności PVY. Ogółem 97,6% roślin w pokoleniu BC_2F_4 charakteryzowało się odpornością na PVY^N w warunkach naturalnej infekcji polowej.

W pokoleniu B_2F_5 uwzględniono w badaniach polowych potomstwo pięciu linii wykazujących odporność w poprzednim pokoleniu. Rośliny tych linii nie wykazywały nekrozy nerwów, lecz na pięciu roślinach spośród dwóch linii występowały przejaśnienia nerwów i słabe plamy chlorotyczne. Detekcja serologiczna wykazała obecność wirusa u ośmiu roślin, co stanowiło 2,1% ogółu badanych roślin. W następnym sezonie badano 10 linii pokolenia B_2F_6. Podobnie jak w poprzednim pokoleniu symptomy chorobowe miały charakter chlorotycznych plam i przejaśnienia nerwów. Obserwowano je u ośmiu roślin w obrębie czterech linii. Za pomocą testu wykryto obecność wirusa u 11 roślin należących do pięciu badanych linii. Obecność wirusa nie była wykrywalna przez przeciwciała monoklonalne (MoAbs anti Y^N). Ogółem wśród badanych linii pokolenia B_2F_6 rośliny odporne stanowiły 98,5%.

Celem weryfikacji odporności stabilnej cytologicznie linii hodowlanej (2n = 48) wyprowadzonej z pokolenia B_2F_6 a określanej jako linia BPA przeprowadzono inokulacje z użyciem izolatów o zróżnicowanej wirulencji należących do grupy PVY^NW i PVY^{NTN}. W badaniach uwzględniono też inne źródła odporności (VAM, Wiślica i *N. africana* oraz podatną odmianę testową Samsun H (tab. 1). W wyniku inokulacji roślin linii BPA izolatem PVY^NW 1 i PVY^NW 2 większość roślin nie wykazywała żadnych objawów chorobowych, 20% roślin reagowało chlorotycznymi plamami (CS) po inokulacji izolatem PVY^NW 1 i 30% po inokulacji PVY^NW 2. Użycie bardziej wirulentnych izolatów — PVY^NW 3 i PVY^{NTN} powodowało przejaśnienia nerwów i plamy chlorotyczne na większości roślin linii BPA.

Tabela 1

Porównanie różnych źródeł odporności na izolaty PVY^{N}W i PVY^{NTN} i reakcji nieodpornej odmiany Samsun H
Comparison of different sources of resistance to PVY^{N}W and PVY^{NTN} isolates and the reaction of a susceptible cv. Samsun H

Izolaty PVY PVY isolates	Liczba roślin inokulowanych — Liczba roślin zainfekowanych Number of inoculated — Number of infected plants														
	BPA			VAM			Wiślica			*N. africana*			Samsun H		
	objawy	ELISA		objawy	ELISA		objawy	ELISA		objawy	ELISA		objawy	ELISA	
	symptoms	*1	**2	symptoms	*1	**2	symptoms	*1	**2	symptoms	*1	**2	symptoms	*1	**2
Y^{N}W 1	16 ns, 4 CS	20/12	20/0	ns	10/0	10/0	ns	10/0	10/0	ns	10/0	10/0	VN	10/10	10/10
Y^{N}W2	14 ns, 6 CS	20/16	20/0	ns	10/0	10/0	VN	10/10	10/0	ns	10/0	10/0	VN	10/10	10/10
Y^{N}W 3	VC, CS	20/20	20/0	VN	10/10	10/0	VN	10/10	10/0	ns	10/0	10/0	VN	10/10	10/10
Y^{NNT} PL	VC,CS	20/20	20/20	VN	10/10	10/10	VN	10/10	10/10	ns	10/0	10/0	VN	10/10	10/10
Y^{NNT} Ge	VC, CS	20/20	20/20	VN	10/10	10/10	VN	10/10	10/10	ns	10/0	10/0	VN	10/10	10/10
Y^{NNT} Fr	VC, CS	20/20	20/20	VN	10/10	10/10	VN	10/10	10/10	ns	10/0	10/0	VN	10/10	10/10

ELISA *1 – Testy wykorzystujące przeciwciała monoklonalne, skierowane przeciwko różnym szczepom PVY; Tests using a coctail of antibodies to detect an enlarged serological spectrum of PVY strains (MoAbs anti Y IgG112911)
ELISA **2 - Testy wykorzystujące przeciwciała monoklonalne, skierowane przeciwko szczepom nekrotycznym PVY; Tests using a monoclonal antibodies against the typical necrotic strain PVY^{N} (MoAbs anti Y^{N} IgG112712)
Ns – Brak objawów, CS – Plamy chlorotyczne, VC – Przejaśnienia nerwów, VN – Nekroza nerwów
Ns – No symptoms, CS – Chlorotic spots, VC – Vein clearing, VN – Vein necrosis

Wirus był wykrywalny za pomocą testów ELISA. Odmiana VAM nie wykazała objawów po użyciu izolatu $PVY^{N}W$ 1, pozyskanego z odmian podatnych oraz $PVY^{N}W$ 2, natomiast Wiślica reagowała nekrozą nerwów po inokulacji izolatem $PVY^{N}W$ 2. Obie te odmiany wykazały silną nekrozę nerwów po inokulacji izolatem $PVY^{N}W$ 3 i trzema izolatami z grupy PVY^{NTN}, podczas gdy linia BPA reagowała tylko przejaśnieniem nerwów (VC), bądź chlorotycznymi plamami. Gatunek *N. africana* nie uległ porażeniu żadnym z użytych izolatów, co potwierdziło jego wysoką odporność. Podatna odmiana Samsun H uległa silnej nekrozie po inokulacji wszystkimi izolatami.

DYSKUSJA

Uzyskanie żywotnych roślin mieszańcowych *N. tabacum* × *N. africana* poprzez kulturę liścieni (Doroszewska, 1994) pozwoliło podjąć próbę dalszego transferu czynników odporności na PVY z *N. africana* do odmian uprawnych. Gatunek ten był opisany jako niezwykle trudny do uzyskania żywotnych form mieszańcowych (Gerstel i in., 1979). Bardzo korzystnym był fakt otrzymania mieszańców poliploidalnych w wyniku prowadzonej kultury *in vitro*. Mieszańcowe formy amfidiploidalne wykazywały wysoką płodność i stabilność. Ważnym aspektem pozwalającym na kontynuację badań nad możliwością dalszego transferu czynników odporności była relatywnie wysoka płodność pokolenia seskwidiploidalnego, umożliwiająca krzyżowanie wsteczne (Doroszewska i Berbeć, 2000).

W pokoleniu poseskwidiploidalnym BC_2 obserwowano zmienność cytologiczną i fenotypową. Liczba roślin odpornych w tym pokoleniu była stosunkowo niska (26,3%). Większość roślin wykazywała nekrozę nerwów, ponadto u części roślin bezobjawowych również wykazano obecność wirusa. Podobny charakter wykazywały rośliny analogicznego pokolenia mieszańców *N. tabacum* cv.BP-210 × *N. benavidesii* (Berbeć i Głażewska, 1988), gdzie liczba roślin odpornych sięgała zaledwie 13,5%.

Procent roślin odpornych w pokoleniu BC_2F_1 był wyższy niż w pokoleniu poseskwidiploidalnym i wynosił 38,3%. Obserwowano niektóre linie wykazujące mniejszą podatność, lecz nie wyodrębniono w tym pokoleniu linii całkowicie odpornych. W następnym pokoleniu BC_2F_2 wprawdzie zmniejszała się liczba uniwalentów i wzrastał udział roślin odpornych, jednakże obserwowano jeszcze dużą zmienność fenotypową i cytologiczną, dotyczącą liczby chromosomów i przebiegu mejozy. W analogicznym pokolenia mieszańcowym *N. tabacum* BP-210 × *N. benavidesii* Berbeć i Głażewska (1988) obserwowali już ustalone linie 48 chromosomowe. Różnice mogą wynikać z odmiennych pozycji systematycznych (przynależności do różnych sekcji) użytych gatunków, ich stopnia pokrewieństwa z *N. tabacum*, a także z liczby chromosomów.

Wzrost stopnia homozygotyczności widoczny był w pokoleniu BC_2F_3, gdzie obserwowano rośliny z liczbą chromosomów 48–50. Pod względem fenotypowym linie te były bardzo zbliżone do odmiany wyjściowej BP-210. W tym pokoleniu wyodrębniono linie, które nie podległy infekcji Y^{N} w warunkach polowych. Jednakże potomstwo tych linii nie było w pełni odporne. Wprawdzie infekcja miała miejsce wśród pojedynczych roślin i objawiała się tylko przejaśnieniem nerwów, bądź wirus wykrywalny był

serologicznie, to wyniki te świadczą, iż cecha odporności w uzyskanych liniach nie była tak silna jak u gatunku dzikiego. Charakteryzowało to również następne pokolenia. Wyniki te mogą sugerować, że odporność na PVY kontrolowana jest przez dwa geny. Taką hipotezę wysuwał też Wernsman (1992). Większość autorów definiuje odporność na PVY jako jednogenową (Gupton i Burk, 1973). Uzyskana przez Koelle (1961) w wyniku mutacji odporność odmiany Virgin A Mutant (VAM) definiowana jest jako odporność recesywna monogeniczna, kontrolowana genem *va*. Ten typ odporności obecny jest w większości odmian uprawianych w Ameryce i wielu krajach Europy. Badania koordynowane przez CORESTA nad obecnością i identyfikacją szczepów wirusa Y ziemniaka w różnych krajach wykazują, że odmiany definiowane jako zawierające gen *va* podlegały znacznie częściej infekcji niż odmiana VAM (Verrier, 2001; Doroszewska i Verrier, 2004), a zatem poziom odporności tych odmian jest również niższy niż odmiany wyjściowej. Badania przy użyciu nekrotycznych izolatów o zróżnicowanym poziomie virulencji pozwoliły wyróżnić trzy alleliczne formy genu *va* o różnym stopniu efektywności: va^0, va^1 i va^2. Najbardziej efektywna forma va^0 obecna jest w genotypie VAM, najsłabsza va^2 w genotypie VD (V.SCR) (Blancard i in., 1995). Zróżnicowaną efektywność tych form może tłumaczyć fakt, iż gen określany jako *va* jest delecją odcinka sekwencji odpowiedzialnego za podatność na PVY (Noguchi i in., 1999). Uzyskana odporność z *N. africana* polega zaś na podstawieniu pewnej sekwencji warunkującej odporność. Słabsza ekspresja cechy odporności w liniach hodowlanych może być również warunkowana wpływem innych genów, tzw. „efektu pozycji", maskującego działanie introdukowanego genu.

Opierając się na uzyskanych wynikach trudno jest jednoznacznie zdefiniować mechanizm przeniesienia odporności na PVY z odpornego gatunku *N. africana* do silnie podatnej odmiany tytoniu. Najmniej prawdopodobna jest możliwość wystąpienia spontanicznej mutacji, w oparciu o którą mogła być prowadzona ścisła selekcja. Pokolenia mieszańcowe wykazywały bowiem cechy obydwu gatunków rodzicielskich (Doroszewska i Berbeć, 1995) i wpływ ten widoczny był przez szereg pokoleń wypierających.

Uzyskane przez autorkę linie hodowlane zawierały 48 chromosomów w komórkach somatycznych oraz 24 biwalenty w komórkach macierzystych pyłku. A zatem status cytogenetyczny tych linii wyklucza możliwość addycji chromosomowej. Również nie może być przyjęta teza o substytucji całego chromosomu. W mieszańcach F_1, F_2 i BC_1 uzyskanych w wyniku krzyżowania stabilnej linii odpornej na PVY z podatną odmianą tytoniu, obserwowano regularną koniugację widoczną w postaci 24 biwalentów (dane nie prezentowane). Nie jest prawdopodobne, aby chromosom pochodzący od *N. africana* podlegał regularnej koniugacji z chromosomem *N. tabacum* w formie substytucyjnej heterozygoty. Podstawienie całego chromosomu wiąże się również z szeregiem innych zmian fenotypowych, związanych z obecnością innych genów przeniesionych wraz z chromosomem. Takich zmian nie obserwowano wśród uzyskanych linii.

Bardziej prawdopodobnym wytłumaczeniem sposobu transferu odporności na PVY od *N. africana* może być zjawisko translokacji, bądź substytucji segmentalnej w początkowych pokoleniach mieszańcowych. Pokoleniem wyjściowym omawianych linii hodowlanych była forma amfidiploidalna, gdzie obserwowano asocjacje multiwalentne

(Doroszewska i Berbeć, 2000), wywołane prawdopodobnie translokacjami. Wyższa frekwencja nie homologicznych translokacji obserwowana była często wśród roślin zbożowych otrzymanych drogą kultur *in vitro* (Lapitan i in., 1984; Feldman, 1988). Wszystkie żywotne formy mieszańcowe *N. tabacum* × *N. africana* uzyskano metodą kultury *in vitro* liścieni (Doroszewska, 1994). Na tym etapie nastąpiła też poliploidyzacja amfihaploidów, dając płodne amfidiploidy (Doroszewska i Berbeć, 2000). W świetle tych wyników translokacja mogła być mechanizmem introgresji cechy odporności.

Innym, prawdopodobnym sposobem przeniesienia cechy odporności mogła być substytucja segmentalna. Warunkiem jej wystąpienia jest przynajmniej sporadyczna koniugacja między chromosomem *N. tabacum*, a jego odpowiednikiem z dzikiego gatunku. Wprawdzie w mieszańcach amfihaploidalnych *N. tabacum* cv. BP-210 × *N. africana* największy udział stanowiły komórki macierzyste pyłku z samymi uniwalentami, to obserwowano również KMP z biwalentami w zakresie 1–5 (Doroszewska i Berbeć, 1996). Moav (1958) sugerował, że substytucja segmentalna może wystąpić na drodze rekombinacji między chromosomami, które wykazują pewien stopień homologii lub też poprzez losowe pęknięcia a następnie łączenie pękniętych odcinków chromosomów. Wykorzystanie przez Lewisa (2005) markerów molekularnych dla linii hodowlanych niosących czynniki odporności od *N. africana* wskazywało, że zjawisko *crossing over* miało miejsce wśród linii z obcym segmentem chromosomu, a zatem każdy fragment od *N. africana* został zintegrowany w pozycji posiadającej podobieństwa strukturalne bądź sekwencyjne umożliwiającej sinapsis z *N. tabacum*. Odmiany *N. tabacum* niosące odporność na wirus mozaiki tytoniowej (*Tobacco mosaic virus*, TMV) z gatunku *N. glutinosa* stanowią także produkt substytucji segmentalnej, gdzie część chromosomu od dzikiego gatunku została wbudowana do chromosomu *N. tabacum* (Chaplin i Burk, 1970). Również Berbeć i Głażewska (1988) jako najbardziej uzasadnioną tezę przeniesienia odporności na PVY z *N. benavidesii* sugerują substytucję fragmentu chromosomu, wskazując ponadto, iż podstawiony fragment musiał być bardzo mały bądź strukturalnie podobny do odpowiednika w genomie tytoniu. Zastosowanie przez Lewisa (2005) markerów molekularnych pozwoliło na określenie linii zawierających najmniejszy fragment chromosomu od *N. africana*, celem eliminacji niekorzystnego wpływu gatunku dzikiego na cechy jakościowe tytoniu. Często bowiem obce fragmenty chromosomu dawały negatywny efekt pod względem agronomicznym i jakościowym (Chaplin i in., 1966, Legg i in., 1981; Johnson i in., 1998). W przypadku linii wyprowadzonych przez autorkę od *N. africana* również można wnosić, że podstawiony fragment był bardzo mały, skoro nie zakłócał koniugacji w heterozygotycznym mieszańcu (odporna linia hodowlana × odmiana podatna). Nie powodował też negatywnych zmian fenotypowych, mających wpływ na plonowanie i jakość surowca w porównaniu z odmianą wyjściową (dane nie publikowane).

Odporność uzyskanych linii BPA na PVY nie była tak wysoka jak u *N. africana*, co przejawiało się obecnością wirusa w soku niektórych inokulowanych roślin. Ważnym aspektem było zastosowanie w badaniach dwu rodzajów przeciwciał firmy Bioreba. Użyte przeciwciała mają zróżnicowaną zdolność wykrywania izolatów należących do różnych grup (Chrzanowska, 1994). Przeciwciała monoklonalne MoAbs anti PVY^N mogą

służyć do wykrywania izolatów szczepu PVY^{NTN}, nie reagują natomiast z izolatami szczepu $PVY^{N}W$. Pozwala to precyzyjnie określić odporność badanych linii oraz potwierdzić tożsamość użytych do inokulacji izolatów. Podwyższona wartość absorbancji u linii BPA po inokulacji niektórymi izolatami wskazuje raczej na odporność typu tolerancji, a nie immunii jak u gatunku dzikiego. Również jako tolerancję określono typ odporności 50-chromosomowej linii addycyjnej z *N. africana* (Wernsman, 1992) i 48-chromosomowych linii uzyskanych przez Lewisa (2005). Dotychczasowe badania prowadzone przez tego autora uwzględniały odporność uzyskanych linii na amerykański szczep PVY^{NN}. Jak wynika z obserwacji porównawczych (doniesienie ustne) szczep ten może być podobny do szczepu $PVY^{N}W$. Wyniki badań odporności uzyskanych linii hodowlanych BPA, nie wykazały objawów nekrotycznych zarówno w warunkach silnej presji PVY w polu, jak też w wyniku inokulacji przy użyciu sześciu izolatów, z których cztery wykazują zdolność wywoływania nekrozy nerwów u istniejących źródeł odporności w obrębie *N. tabacum*. Część roślin wykazywała jednak przejaśnienia nerwów i chlorotyczne plamy a wirus był wykrywalny metodą serologiczną. Można zatem wnosić, że wbudowana odporność ma charakter tolerancji wobec najważniejszych szczepów PVY. Fakt ten jest niezwykle ważny w sytuacji rozprzestrzeniania się szczepów i izolatów coraz bardziej agresywnych, przełamujących odporność w obrębie *N. tabacum*.

WNIOSKI

1. Transfer czynników odporności na PVY z dzikiego gatunku *N. africana* prowadzono w oparciu o formę mieszańcową (BC_2) i następnie poprzez samozapylenia kolejnych pokoleń. Obserwowano zmienną liczbę chromosomów mitotycznych w poszczególnych pokoleniach i stopniową eliminację chromosomów pochodzących z gatunku dzikiego.
2. Wraz z eliminacją chromosomów pochodzących z *N. africana* następował wzrost żywotności pyłku. Stabilne 48-chromosomowe linie stwierdzono w pokoleniu BC_2F_4.
3. W badaniach odpornościowych wcześniejszych pokoleń, przy użyciu bardzo wirulentnego szczepu PVY^{NZ} oraz w wyniku selekcji prowadzonej w warunkach naturalnej infekcji polowej w obrębie dalszych pokoleń, wyodrębniono linie odporne bądź tolerancyjne na występujące izolaty. Rośliny pokolenia BC_2F_4–BC_2F_6 nie wykazywały objawów nekrotycznych.
4. Inokulacja linii BPA, będącej potomstwem pokolenia BC_2F_6, przy użyciu sześciu wirulentnych izolatów, należących do różnych szczepów PVY, nie wywołały objawów nekrotycznych, natomiast część roślin wykazywała przejaśnienia nerwów i wirus był wykrywalny metodą serologiczną. Wskazuje to na tolerancyjny charakter odporności linii BPA wobec najważniejszych izolatów.
5. Odporność linii hodowlanych była zdecydowanie wyższa niż odmian uprawnych *N. tabacum*, co przejawiało się brakiem reakcji nekrotycznych na roślinie, natomiast nieco niższa niż użytego do transferu odporności gatunku *N. africana*. Słabsza ekspresja cechy odporności w liniach hodowlanych mogła być warunkowana

wpływem innych genów, tzw. „efektu pozycji” maskującego działanie introdukowanego genu.

6. W porównaniu z dotychczas istniejącymi źródłami odporności w obrębie *N. tabacum*, linie BPA jako jedyne nie wykazują reakcji nekrotycznych roślin po inokulacji najbardziej wirulentnymi izolatami. Świadczy to o uzyskaniu nowego źródła odporności, cennego dla hodowli użytkowej w sytuacji wzrostu frekwencji patogenicznych izolatów PVY.

LITERATURA

Ano G., Blancard D., Cailleteau B. 1995. Mise au point sur la resistance recessive aux souches necrotiques du virus Y de la pomme de terre (PVY) presente chez Nicotiana. Ann. Tabac. 2 (27): 35 — 42.

Berbeć A., Głażewska Z. 1988. Transfer of resistance to Potato virus Y from Nicotiana benavidesii Goodspeed to N. tabacum. Gen. Pol. 29 (3–4): 323 — 333.

Blancard D., Ano G., Cailleteau B. 1995. Etude du pouvoir pathogėne d’isolates de PVY sur tabac: proposition d’une classification intėgrant la rėsistance a la nėcrose. Ann Tabac 27:43 — 50.

Burns J. A. 1964. A technique for making preparations of mitotic chromosomes from Nicotiana flowers. Tob Sci 8: 1 — 2.

Burns J. A. 1982. The chromosomes of Nicotiana africana Merxm.: a recently discovered species. J. Hered. 73: 115 — 118.

Chaplin J. F., Burk L. G. 1970. Interspecific hybridization and gene transfer in Nicotiana: Problems and possible solution. 5th Int. Tob. Sci. Congr. Proc. 59: 67.

Chaplin J. F., Matzinger D. F., Mann T. J. 1966. Influence of the homozygous and heterozygous mosaic-resistance factor on quantitative character of flue-cured tobacco. Tob. Sci. 10: 81 — 84.

Chrzanowska M. 1994. Differentiation of potato virus Y (PVY) isolates. Phytopathol. Pol. 20 (8): 15 — 20.

Chrzanowska M., Doroszewska T. 1997. Comparison between PVY isolates obtained from potato and tobacco plants in Poland. Phytopathol. Pol. 13: 63 — 71.

Chrzanowska M., Doroszewska T. 2004. Biological differentiation of the PVY strains found in potato and tobacco in Poland. 12th EAPR Virology Section Meeting Rennes, France: 44 pp.

Chrzanowska M,. Doroszewska T., Zagórska H., 2002. Zróżnicowanie izolatów wirusa Y ziemniaka w zależności od kryterium oceny. Acta Agrobot. 55 (1): 59 — 67.

Delon R., Fisher C. R, Blancard D. 1993. Survey on tobacco viruses. CORESTA Inf. Bull. No. 4:72 — 79.

Doroszewska T. 1994. Przełamywanie barier nieżywotności i bezpłodności międzygatunkowych mieszańców Nicotiana tabacum L. × Nicotiana africana Mrxm. metodą kultur tkankowych. Prace Ogrodu Botanicznego PAN 5/6: 465 — 472.

Doroszewska T. 2002. Potential sources of resistance to three strains of Potato virus Y in the genus Nicotiana. Inf. Bull. CORESTA Congress New Orleans: 29 pp.

Doroszewska T., Berbeć A. 1994. Resistance to PVY of interspecific hybrids of several flue-cured tobacco cultivars with Nicotiana africana Merxm. Inf. Bull. CORESTA, Zimbabwe: 145 pp.

Doroszewska T., Berbeć A. 1995. Growth and development of the interspecific F1 hybrids Nicotiana tabacum L. x N. africana Merxm. involving different N. tabacum cultivars. Inf. Bull. CORESTA Agron. Phytopathol. Meet Oxford: 8 p.

Doroszewska T., Berbeć A. 1996. Chromosome pairing and microsporogenesis in interspecific F1 hybrids of Nicotiana africana with different cultivars of N. tabacum. J. Genet. Breed. 50: 75 — 82.

Doroszewska T., Berbeć A. 2000. Cytogenetical investigations of poliploid interspecific hybrids of Nicotiana africana with different cultivars of N. tabacum. J. Genet. Breed. 54: 77 — 82.

Doroszewska T., Verrier J. L. 2004. Sub-Group Collaborative Study on Potato virus Y. Annual Subgroup report CORESTA CD-ROM Version No20.

Feldman M. 1988. Cytogenetic and molecular approaches to alien gene transfer in wheat. Proc. of the Seventh Int. Wheat Genet. Syp. 1: 23 — 32.

Gajos Z. 1971. Silnie wirulentny szczep wirusa Y na tytoniu w Polsce, jego występowanie i właściwości w porównaniu ze szczepami nekrotycznym i zwykłym. Zesz. Probl. Post. Nauk. Rol., 115: 87 — 98.
Gerstel D. U., Burns J. A., Burk L. G. 1979. Interspecific hybridizations with an African tobacco, Nicotiana africana Merxm. J. Hered. 70: 342 — 344.
Gugerli P., Fries P. 1983. Characterization of monoclonal antibodies to potato virus Y and their use for virus detection. J. Gen. Virol. 64: 2471 — 2477.
Gupton C. L, Burk L. G. 1973. Location of the factor for resistance to potato virus Y in tobacco. J. Hered. 64: 289 — 290.
Johnson E. S., Wolff H. D., Rufty R. C., Wernsman E. A. 1998. Consequences of gametic selection for black shank resistance in populations segregating for qualitative and quantitative resistance sources. Inf. Bull. CORESTA Brighton England:129 p.
Koelle G. 1961. Genetische Analyse einer Y-virus (Rippenbraune) resistenten Mutante der Tabaksorte Virgin A. Zuchter. 31: 71 — 72.
Lapitan N. L. V., Sears R. G., Gill B. S. 1984. Translocation and other caryotypic structural changes in wheat x rye hybrids regenerated from tissue culture. Theor. Appl. Gen. 68: 547 — 554.
Legg P. D., Litton C. C., Collins G. B. 1981. Effects of the Nicotiana debneyi black root rot resistance factor on agronomic and chemical traits in burley tobacco. Theor. Appl. Genet. 60: 365 — 368.
Lewis R. S. 2005. 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. 110: 678 — 687.
Lucas G. B. 1975. Diseases of tobacco. Biological Consulting Assoc, Raleigh, N.C.
Lucas G. B., Gooding G. V. Jr., Sasser J. N., Gerstel D. U. 1980. Reaction of Nicotiana africana to black shank, Granville wilt, tobacco mosaic virus and potato virus Y. Tob. Sci. 24: 141 — 142.
Moav R. 1958. Inheritance in Nicotiana tabacum. XXIX. The relationship of residual chromosome homology to interspecific gene transfer. Am. Nat. 92: 267 — 278.
Noguchi S., Tajima T., Yamamoto Y., Ohno T., Kubo T. 1999. Deletion of a large genomic segment in tobacco varieties that are resistant to potato virus Y (PVY). Mol. Gen. Genet. 262: 822 — 829.
Verrier J. L. 2001. PVY Collaborative Experiment. Altadis, Institut du Tabac, Bergerac, France.
Verrier J. L., Marchand V., Cailleteau B., Delon R. 2001. Chemical change and cigarette smoke mutagenity increase associated with CMV-DTL and PVY-N infection in burley Tobacco. Bull. Inf. CORESTA, Cape Town: 1 p.
Wen C., Wu Y., Li H., Wang H., Liu Q. 1999. Influences on photosynthesis and respiration of tobacco infected by potato virus Y — vein necrosis strain. Bull. Inf. CORESTA Suzhou, China: 10 — 11.
Wernsman E. A. 1992. Source of resistance to virus diseases. CORESTA Inf. Bull. 3/4: 113 — 119.