

**STUDIA I RAPORTY  
IUNG-PIB**

**68(22)**



**OSIĄGNIĘCIA I WYZWANIA  
PRODUKCJI CHMIELU I TYTONIU**

DOTACJA CELOWA  
2022

Puławy 2022



INSTYTUT UPRAWY NAWOŻENIA I GLEBOZNAWSTWA  
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

**STUDIA I RAPORTY  
IUNG-PIB**

**68(22)**

**OSIĄGNIĘCIA I WYZWANIA  
PRODUKCJI CHMIELU I TYTONIU**

**DOTACJA CELOWA  
2022**

**Puławy 2022**

INSTYTUT UPRAWY NAWOŻENIA I GLEBOZNAWSTWA  
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

Dyrektor: *prof. dr hab. Wiesław Oleszek*

Redakcja naukowa:

*dr Urszula Skomra*

Autorzy:

*prof. dr hab. Apoloniusz Berbeć; mgr Diana Czarnecka; dr Anna Czubačka;  
mgr Anna Depta; mgr Magdalena Kawka-Lipińska; dr Grażyna Korbecka-Glinka;  
mgr Marta Koziara-Ciupa; mgr Hanna Olszak-Przybyś; dr Marcin Przybyś;  
dr Urszula Skomra; dr hab. Anna Trojak-Goluch*

Recenzenci:

*prof. dr hab. Apoloniusz Berbeć; dr Anna Czubačka;  
prof. dr hab. Teresa Doroszeńska; dr Marcin Przybyś; dr Urszula Skomra;  
dr hab. Anna Trojak-Goluch*

Opracowanie redakcyjne i techniczne: *mgr Katarzyna Mikulska*

Okładka: krajobraz okolic Rogowa (fot. *dr Anna Nieróbca*)

ISBN 978-83-7562-390-1

Publikacja elektroniczna

*Egzemplarz bezpłatny*

Nakład 300 egz., B5

Dział Upowszechniania i Wydawnictw IUNG-PIB w Puławach

tel. (81) 47 86 720; fax (81) 47 86 721

e-mail: [iung@pulawy.pl](mailto:iung@pulawy.pl); <http://www.iung.pulawy.pl>

STUDIA I RAPORTY IUNG-PIB

**OSIĄGNIĘCIA I WYZWANIA  
PRODUKCJI CHMIELU I TYTONIU**



## SPIS TREŚCI

Wstęp .....	7
1. Berbeć A. – Hodowla odpornościowa na mozaikę tytoniu: zarys historii badań na świecie i aktualny stan hodowli w Polsce .....	9
2. Korbecka-Glinka G. – Osiągnięcia i wyzwania w hodowli tytoniu odpornego na wirusa brązowej plamistości pomidora (TSWV).....	33
3. Depta A. – Odporność tytoniu na wirusa Y ziemniaka i prace hodowlane prowadzone w kierunku uzyskania form odpornych .....	45
4. Przybyś M. – Wirus mozaiki ogórka (CMV) i wirus brązowej plamistości pomidora (TSWV) – występowanie, budowa i klasyfikacja .....	65
5. Czarnecka D. – Biologia i występowanie <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary w uprawie tytoniu i chmielu oraz możliwości jej ograniczania .....	91
6. Kawka-Lipińska M., Trojak-Goluch A. – Poliploidy tytoniu i chmielu – metody otrzymywania, ocena fenotypu, składu chemicznego oraz wykorzystanie w hodowli .....	111
7. Trojak-Goluch A., Kawka-Lipińska M. – Główne alkaloidy tytoniu – charakterystyka, przemiany w roślinie oraz wyzwania dla hodowli roślin .....	129
8. Czubacka A. – Genetyczne podstawy produkcji wybranych metabolitów wtórnych chmielu.....	151
9. Olszak-Przybyś H. – Metody stosowane w badaniach zróżnicowania oraz identyfikacji odmian chmielu.....	167
10. Koziara-Ciupa M. – Wpływ suszenia i przechowywania na wartość technologiczną chmielu .....	183
11. Skomra U. – Uwarunkowania i kierunki rozwoju produkcji chmielu.....	197



## Wstęp

Produkcja chmielu i tytoniu należy do najbardziej wyspecjalizowanych sektorów branży rolniczej, wymagających fachowej wiedzy w zakresie agrotechniki, ochrony, wstępnego przetwarzania surowca, a także wyposażenia gospodarstw w dedykowane dla tych gatunków maszyny i suszarnie. Z uwagi na to tradycja uprawy jest często przekazywana z pokolenia na pokolenie, a produkcja koncentruje się w wyspecjalizowanych gospodarstwach rolnych, w których gatunki te stanowią główne, a często jedyne, źródło dochodów. Produkcja chmielu i tytoniu jest ukierunkowana w dużej mierze na zaspokojenie potrzeb i wymagań jednego dominującego odbiorcy, jakim w przypadku chmielu jest przemysł piwowarski, a tytoniu – przemysł tytoniowy. Oba wspomniane sektory gospodarki mają charakter globalny, co dla polskich plantatorów oznacza konieczność konkutowania na rynkach światowych zdominowanych przez dużo większych producentów, również spoza Europy. Spełnienie wymagań przemysłu piwowarskiego i tytoniowego w stosunku do jakości surowca i sprostanie konkurencji na światowych rynkach stanowią duże wyzwania dla producentów chmielu i tytoniu. Wyzwania te są jednocześnie impulsem do poszukiwania i wdrażania rozwiązań pozwalających na uzyskanie najlepszych efektów produkcji w warunkach zmieniającego się klimatu oraz mając na uwadze dbałość o stan równowagi środowiska naturalnego i zdrowie ludzi. W przypadku tytoniu dużą rolę odgrywają też uwarunkowania społeczno-polityczne, a w szczególności prowadzona przez wiele organizacji, w tym Światową Organizację Zdrowia (WHO), kampania mająca na celu ograniczenie popytu i podaży wyrobów tytoniowych.

W niniejszym zeszycie serii Studia i Raporty IUNG-PIB przedstawiono szereg zagadnień dotyczących istotnych problemów w uprawie chmielu i tytoniu, które jednocześnie są przedmiotem analiz i badań prowadzonych w ramach dotacji budżetowej przeznaczonej na realizację zadań Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi w 2022 roku.

Jednym z istotnych problemów w uprawie chmielu i tytoniu jest duże zagrożenie ze strony organizmów szkodliwych spowodowane, między innymi, długoletnią uprawą w monokulturze (chmiel) oraz uproszczeniami płodozmianu (tytoń). Problemy te są potęgowane przez zmiany klimatu, które z jednej strony niosą niebezpieczeństwo pojawiania się ekstremalnych zjawisk pogodowych i związane z tym stresy abiotyczne osłabiające odporność roślin, z drugiej zaś strony oddziałują na organizmy szkodliwe stwarzając dogodne warunki do rozwoju gatunków, które dotychczas występowały sporadycznie lub nie były spotykane na terenie naszego kraju. Najskuteczniejszą, a zarazem najbardziej przyjazną dla środowiska metodą ograniczania organizmów szkodliwych jest uprawa odmian odpornych. W Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa Państwowym Instytucie Badawczym od wielu lat prowadzone są prace hodowlane w kierunku uzyskania odmian tytoniu i chmielu odpornych na choroby wirusowe i grzybowe. W kilku rozdziałach monografii zaprezentowano efekty dotychczasowych prac oraz wyzwania na przyszłość. Omówiono również budowę, występowanie i znaczenie wybranych organizmów szkodliwych dla chmielu i tytoniu



oraz strategie wykorzystywane w ochronie roślin do ich ograniczania. Jedną z metod poprawy wybranych cech gatunków uprawnych lub zwiększenia ich odporności na stesy biotyczne i abiotyczne jest otrzymywanie poliploidów. W monografii przedstawiono metody zwielokrotniania genomów i właściwości poliploidów tytoniu i chmielu oraz wykorzystanie poliploidyacji w pracach hodowlanych. Ponadto poruszono kwestie dotyczące biosyntezy i właściwości najważniejszych alkaloidów tytoniu oraz możliwości obniżenia ich zawartości z wykorzystaniem zarówno praktyk agrotechnicznych, jak i metod hodowlanych. Tematyka ta jest szczególnie istotna w świetle rekomendacji WHO odnośnie obniżenia zawartości nikotyny w produktach tytoniowych, ale problem ten jest ważny również z punktu widzenia oceny przydatności surowca do produkcji papierosów tradycyjnych i elektronicznych.

Podstawowym miernikiem jakości chmielu jest zawartość w szyszkach wybranych metabolitów wtórnych, takich jak kwasy goryczkowe, olejki eteryczne czy polifenole. W monografii przedstawiono genetyczne podstawy produkcji najważniejszych metabolitów oraz czynniki biotyczne i abiotyczne wpływające na aktywność genów zaangażowanych w syntezę tych związków. Innym aspektem uzyskania surowca chmielowego o określonym składzie chemicznym oraz długotrwałego utrzymania jego parametrów jakościowych jest kontrola tożsamości i jednolitości odmianowej, a także odpowiednie wstępne przetworzenie i magazynowanie. Tym zagadnieniom poświęcone są kolejne rozdziały monografii. Uzupełnieniem prezentowanych tematów jest analiza stanu i kierunków zmian na światowym rynku chmielu w ostatnim dziesięcioleciu, która pozwala na ocenę możliwości rozwoju tej branży w najbliższej przyszłości i ułatwia podejmowanie decyzji w zakresie produkcji chmielu.

Tematyka zeszytu związana jest z realizacją dwóch zadań w ramach dotacji budżetowej przeznaczonej na realizację zadań Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi w 2022 roku:

Zadanie 6.3. Upowszechnianie wiedzy o wynikach uzyskiwanych w ramach realizacji zadania (Hodowla i nasiennictwo chmielu i tytoniu);

Zadanie 7.1. Opracowanie i aktualizacja Programów integrowanej ochrony roślin uprawnych w zakresie tytoniu i chmielu.

Kierownik zadania 6.3  
*dr hab. Anna Trojak-Goluch*

Kierownik zadania 7.1  
*dr Urszula Skomra*

Apoloniusz Berbeć

*Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy  
w Puławach*

## HODOWLA ODPORNOŚCIOWA NA MOZAIKĘ TYTONIU: ZARYS HISTORII BADAŃ NA ŚWIECIE I AKTUALNY STAN HODOWLI W POLSCE\*

**Słowa kluczowe:** tytoń szlachetny, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana glutinosa*, hodowla, odporność, mozaika tytoniu, TMV

### Uwagi wstępne o patogenie mozaiki tytoniu i samej chorobie

Mozaika tytoniu jest chorobą występującą we wszystkich krajach, gdzie uprawiany jest tytoń i pierwszą poznaną chorobą pochodzenia wirusowego. Adolf Mayer, Holender pracujący w rolniczej stacji doświadczalnej w Wageningen, był pierwszym, który w 1879 r. użył nazwy wirus na określenie sprawcy choroby wywołującej mozaikowatość liści tytoniu. Naukowiec ten wykazał ponadto, że chorobę tę można wywołać u rośliny zdrowej poprzez pocieranie jej liści sokiem z liści rośliny chorej. Niemniej jednak Meyer był przekonany, że ma do czynienia z chorobą wywołaną odrębnym rodzajem bakterii (44). Inny dziewiętnastowieczny badacz Rosjanin Dymitr Iwanowski stwierdził, że sok z roślin chorych na mozaikę zachowuje zdolności infekcyjne po przepuszczeniu przez filtr zatrzymujący bakterie (44), ale podobnie jak Meyer uważał, że sprawcą choroby jest bardzo mała bakteria lub przetrwalnik bakteryjny (54). Dopiero badania Beyerincka wykazały, że wirus mozaiki tytoniowej nie jest szczególnym rodzajem bakterii lub toksyną chemiczną, ale zupełnie odrębnym, żywym i mającym zdolność samopowielania się czynnikiem chorobotwórczym (44). Prowadzone już w XX w. badania nad wirusem mozaiki tytoniu pozwoliły stwierdzić, że ma on charakter korpuskularny, a nie płynny, jak sądził Beyerinck, i jest połączeniem białka otaczającego jednoniciowe RNA (44). W ten sposób odkrycia dotyczące wirusa mozaiki tytoniowej legły u podstaw wirusologii jako nauki, a sam wirus mozaiki tytoniowej, znany pod skrótem angielskiej nazwy TMV (ang. *Tobacco Mosaic Virus*), stał się najlepiej poznanym wirusem.

\*Opracowanie wykonano w ramach zadania 6.3 pt. „Upowszechnianie wiedzy o wynikach uzyskiwanych w ramach realizacji zadania (hodowla i nasiennictwo chmielu i tytoniu)” z dotacji budżetowej przeznaczonej na realizację zadań MRiRW w 2022 r.

Jak zasygnalizowano na początku artykułu, mozaika tytoniu jest bodajże najbardziej rozpowszechnioną chorobą tytoniu występującą na wszystkich kontynentach i we wszystkich krajach uprawiających tę roślinę, bez względu na szerokość geograficzną, aczkolwiek w krajach cieplejszych zwykle występuje wcześniej i w większym nasileniu. Skala szkód wywołanych przez mozaikę tytoniu uzależniona jest głównie od fazy wzrostu i rozwoju rośliny, w której wystąpi zakażenie. Jak podaje Kaznowski (30), największe straty plonu występują na plantacjach, na których wysadzono zakażoną rozsadę. W takim przypadku objawy mozaiki mogą wystąpić już we wczesnych fazach rozwoju. Również Chaplin (10) stwierdził, że zainfekowanie roślin w młodym wieku przynosi większą obniżkę plonu, niż infekcja u roślin starszych. W odróżnieniu od wielu innych chorób, których atak we wczesnej fazie najczęściej powoduje wypadanie roślin, zainfekowanie mozaiką tytoniową zwykle nie pociąga za sobą śmierci rośliny. Niemniej jednak rośliny zaatakowane wcześniej wykazują znaczne zahamowanie wzrostu, a w przypadku bardzo wczesnych zakażeń – nawet karłowatość, co prowadzi do częściowej bądź całkowitej utraty plonu. Na szczęście wczesne masowe zakażenia mozaiką występują na polach dość rzadko, a w większości przypadków choroba rozprzestrzenia się na polu stopniowo, poprzez zakażenia mechaniczne wywołane głównie prowadzeniem w polu prac pielęgnacyjnych. W tych przypadkach zakażenie nie pociąga za sobą zmniejszenia plonu, ale wpływa na jakość wysuszonych liści, szczególnie, jeśli liście wykazują bardzo intensywne objawy mozaikowatości. Liście takie suszą się źle, po wysuszeniu wykazują niejednorodność barwy i niekorzystne zmiany struktury (17).

## **Historia badań nad odpornością na mozaikę tytoniu**

### **Odporność typu Ambalema**

Odporność tytoniu na wirus TMV znana jest od lat trzydziestych XX w. Na początku brak objawów chorobowych po zakażeniu wirusem TMV wykryto u kolumbijskiej odmiany Ambalema (53). Nie była to pełna odporność, lecz jedynie tolerancja na zakażenie polegająca na tym, że wirus namnażał się w roślinie, nie powodując widocznych objawów. Ten typ odporności okazał się nieprzydatny do celów hodowli, ponieważ był trudny do przeniesienia do innych odmian, gdyż cecha tolerancji warunkowana była przez łączne działanie kilku niezależnych recesywnych genów. Ponadto nawet w przypadku pomyślnego wbudowania kompletu tych genów do uodpornianej odmiany, nowa kreacja wykazywała znacznie mniejszy plon i obniżoną jego jakość, a także silną podatność na wędnięcie i oparzenia w okresach upalnej pogody (53).

## Pierwsze próby wykorzystania introgresji międzygatunkowej w hodowli tytoniu odpornego na mozaikę

Podjęto prace nad uzyskaniem tytoniu szlachetnego odpornego na mozaikę tytoniu z wykorzystaniem dwóch dzikich gatunków: *Nicotiana rustica* i *N. glutinosa*. Krzyżowanie międzygatunkowe jest procesem trudnym, gdyż w większości przypadków wymaga przełamania barier krzyżowalności, nieprzeżywalności, a także bezpłodności mieszańców, które u różnych kombinacji mieszańcowych występują w różnym nasileniu, ale generalnie zwiększają się wraz z dystansem filogenetycznym między krzyżowanymi formami. Wykorzystanie obcego gatunku *N. rustica* jako źródła odporności na chorobę u tytoniu uprawnego jest prawdopodobnie pierwszym zakończonym powodzeniem i udokumentowanym przedsięwzięciem tego rodzaju (26). F.O. Holmes – amerykański genetyk i hodowca pracujący w pierwszej połowie XX w., przeniósł czynnik odporności na wirus TMV z gatunku *N. rustica* do tytoniu uprawnego. Między tymi dwoma gatunkami istnieje silna bariera krzyżowalności, dlatego Holmes na początku skrzyżował gatunek *N. rustica* ze znacznie bliżej spokrewnionym gatunkiem *N. paniculata*, który również bez specjalnych trudności krzyżuje się z tytoniem uprawnym. Wskutek wielokrotnych krzyżowań udało mu się w naturalny sposób przełamać barierę bezpłodności mieszańca *N. paniculata* × *N. rustica* i w następstwie krzyżowań wstecznych z *N. paniculata* i selekcji odtworzył formę *N. paniculata* odporną na wirus TMV. Odporną formę *N. paniculata* skrzyżował z tytoniem szlachetnym (*N. tabacum* odmiana Samsun) i na drodze kolejnych krzyżowań wstecznych wyselekcjonował formę tytoniu Samsun z czynnikiem odporności od *N. rustica*. Opisana powyżej procedura jest również pierwszym opisanym przypadkiem zastosowania krzyżowania pomostowego w hodowli międzygatunkowej u tytoniu. W metodzie tej, realizowanej w poszczególnych przypadkach w różny sposób, rolę pośrednika w introgresji między dwoma gatunkami pełni gatunek trzeci (7, 18, 23), a nawet dwa gatunki pośredniczące (45). Odporność na wirus TMV od *N. rustica* miała jednak poważną wadę. Oparta ona była na reakcji nadwrażliwości na infekcję, ale rośliny dopiero z wiekiem nabierały zdolności do ograniczania infekcji w lokalnych nekrozach, co sprawiało, że siewki i młode rośliny w polu nie były odporne.

### Przeniesienie odporności na mozaikę tytoniu z gatunku *Nicotiana glutinosa* do tytoniu szlachetnego

Holmes (26) prowadził równoległe prace nad pozyskaniem odporności na wirus mozaiki od innego dzikiego gatunku tytoniu – *N. glutinosa*. Gatunek ten również reagował nadwrażliwością i lokalnymi nekrozami na infekcję, ale w odróżnieniu od *N. rustica* jego odporność była niezależna od fazy wzrostu. Na początku największą trudność stanowiła bezpłodność mieszańca  $F_1$  *N. tabacum* × *N. glutinosa*, której nie udało się przełamać mimo długotrwałych usiłowań. Holmes w dalszej pracy posłużył

się płodną formą o podwojonej liczbie chromosomów uzyskaną wcześniej przez innego Amerykanina prof. Clausena (12, 26). Droga kolejnych krzyżowań wstecznych do gatunku uprawnego Holmes zdołał wyselekcjonować linię orientalnej odmiany Samsun wykazującą pełną odporność gatunku dzikiego. Odporność tej linii była warunkowana monogenicznym czynnikiem odporności nazwanej genem N. Odmiana ta do dziś występuje w kolekcjach pod nazwami Samsun Holmesa lub Samsun H.

Pewną ciekawostką, jeśli chodzi o prace Holmesa jest to, że bezpośrednim celem jego badań nie było zapobieżenie stratom plantatorów tytoniu, ale zapewnienie ochrony plantacji roślin psiankowatych (papryka, pomidory). Sąsiadujące z nimi pola tytoniowe zakażone mozaiką tytoniową były bowiem uważane za podstawowe źródło infekcji dla tych upraw (45).

Równoległe z badaniami Holmesa, podobne prace nad wykorzystaniem *N. glutinosa* do wyhodowania tytoniu uprawnego odpornego na mozaikę tytoniu były prowadzone w USA przez Goodspeeda (22), a wysiłki w tym kierunku podjęto także w kilku innych krajach, m.in. ZSRR. Prace te już z początkiem lat czterdziestych doprowadziły do wyhodowania pierwszych odmian w orientalnym typie Diubek odpornych na mozaikę tytoniu (48, 49, 50, 51). Prace nad przeniesieniem odporności na mozaikę z *N. glutinosa* podjęto w połowie XX w. również w Bułgarii (31), a nieco później także w Japonii (40).

W USA już na początku lat czterdziestych wprowadzono do uprawy pierwsze odmiany tytoniu w typie Burley odporne na mozaikę tytoniową, mimo że praktyczność zastosowania odporności typu N budziła wtedy jeszcze spore kontrowersje (53).

### **Badania genetyczne nad przeniesieniem i mechanizmem odporności od *N. glutinosa***

#### **Substytucja chromosomowa**

Już pierwsi hodowcy zajmujący się wykorzystaniem odporności na TMV od *N. glutinosa* zauważyli, że w wyniku krzyżowań wstecznych i selekcji w kierunku odporności między wyprowadzonymi liniami odpornymi występuje duża zmienność i większe lub mniejsze odchylenia od typu odmiany wypierającej (53). Cechy te były najczęściej negatywne z punktu widzenia przydatności do uprawy. Już wtedy podejrzewano, że te niepożądane skutki były wywołane obecnością materiału genetycznego z obcego gatunku wprowadzonego wraz z czynnikiem odporności. Badania Mallacha (37) i Gerstela (19) nad odmianą Samsun H wykazały, że posiada ona 23 pary chromosomów tytoniu uprawnego i jedną parę od *N. glutinosa*. Oznaczało to, że przynajmniej w przypadku tej konkretnej linii wraz z odpornością wprowadzony został cały chromosom obcego gatunku, który wszedł w miejsce natywnego chromosomu H, co wykazał Gerstel (19) na podstawie analizy monosomicznej. Doszło w ten sposób do tzw. substytucji chromosomowej i związanych z nią widocznych negatywnych skutków takiego mechanizmu introgresji międzygatunkowej, objawiających

się jako spowolnienie wzrostu, zmniejszona powierzchnia liścia i w konsekwencji zmniejszony plon (52).

Z punktu widzenia hodowcy substytucja całego chromosomu pociągała za sobą zbyt poważne negatywne konsekwencje, by mogła znaleźć zastosowanie w praktycznej hodowli. Z drugiej zaś strony już pierwsze obserwacje linii odpornych na mozaikę wskazywały, że negatywne skutki odporności były zróżnicowane – od poważnych zakłóceń wzrostu i rozwoju do objawów znacznie słabszych, na poziomie akceptowalności (50). Zwrócono również uwagę na to, że w wyniku długotrwałej selekcji możliwy jest postęp hodowlany w tym względzie, czego dowodem była produkcyjna odmiana Burley 21 (21, 25).

### Substytucja segmentalna

Gerstel (20) oraz Gerstel i Burk (21) stwierdzili, że w odmianie Burley 21 występuje nie cały chromosom *N. glutinosa*, lecz tylko jego fragment (segment) zintegrowany z chromosomem *N. tabacum*. Na podstawie tzw. analizy monosomicznej udało się ponadto ustalić, że wstawka dotyczy chromosomu H tytoniu uprawnego (21). Potwierdzono w ten sposób zjawisko substytucji segmentalnej, podstawowego mechanizmu w procesie hodowli międzygatunkowej prowadzonej metodami konwencjonalnymi. Ten fragment chromosomu był jednak wciąż na tyle długi, że zawierał wiele niepożądanych genów zakłócających jakość uzyskiwanego surowca. Dalszy proces hodowli tytoniu odpornego na mozaikę tytoniu koncentrował się na uzyskaniu jak najmniejszej wstawki chromosomowej w nowych odpornych odmianach, by w ten sposób ograniczyć niepożądane efekty wprowadzanej odporności, czyli szkodliwe sprzężenia (ang. *linkage drag*).

### Szkodliwe sprzężenia związane z odpornością na mozaikę tytoniu

Jeśli chodzi o oddzielenie cechy odporności od innych – w większości niepożądanych – cech wnoszonych wraz z odpornością do formy uprawnej, to w pierwszym okresie hodowli odmian odpornych na mozaikę krzyżowania wsteczne połączone z selekcją pożądanego fenotypu wydawały się naturalnym i skutecznym podejściem, które wielokrotnie się już sprawdziło w hodowli w obrębie gatunku (53).

Z ogólnych praw dziedziczenia na poziomie chromosomalnym wynika, że w pełni niezależne dziedziczenie dotyczy cech, a więc i genów, znajdujących się na różnych chromosomach traktowanych jako tzw. grupy sprzężeń. Jeśli chodzi o cechy na tym samym chromosomie, to w zasadzie znajdujące się na nim geny przekazywane są potomstwu w jednym pakiecie, czyli wspomnianej wcześniej grupie sprzężeń. Niemniej jednak segregacja cech w obrębie grupy sprzężeń jest też możliwa na drodze rekombinacji, czyli wymiany odcinków w obrębie koniugujących ze sobą chromosomów homologicznych, tzn. należących do tej samej pary. Częstość takiej wymiany zależy od położenia genu na chromosomie: im bliższa fizyczna odległość między

dwoma genami warunkującymi określone cechy, tym mocniejsze sprzężenie tych cech i mniejsze prawdopodobieństwo ich rozdzielenia (segregacji).

W mieszańcach w obrębie gatunku rekombinacja jest zjawiskiem stałym i regularnym. W mieszańcach międzygatunkowych taki przepływ informacji genetycznej jest silnie zakłócony lub nawet zablokowany wskutek różnic w liczbie lub/i strukturze chromosomów poszczególnych gatunków. Ponadto, jeśli nawet zjawisko koniugacji i przepływ informacji genetycznej w mieszańcach międzygatunkowych występuje, jest to z reguły zjawisko sporadyczne i losowe, niepodlegające regularnym prawom dziedziczenia.

W przypadku hodowli odmian odpornych na mozaikę tytoniu przy użyciu genu N z obcego gatunku *N. glutinosa* bariera sprzężeń okazała się zwielokrotniona. Powodem była jeszcze jedna właściwość transferu międzygatunkowego, a mianowicie drastycznie ograniczona lub nawet zablokowana rekombinacja w obrębie samej wstawki (substytucji segmentalnej) i w rejonach bezpośrednio z nią sąsiadujących. Pierwsi wykazali to Johnson i in. (29) dla substytucji fragmentu chromosomu od gatunku *N. longiflora* warunkującej odporność na zgniliznę pierścieniową podstawy łodygi tytoniu powodowaną przez grzybopodobnego lęgniowca *Phytophthora parasitica*. W przypadku substytucji zawierającej gen N ta prawidłowość została potwierdzona przez Lewisa i in. (35, 36) i Lewisa i Rose (27). Lewis i in. (34) wskazali, że w przypadku substytucji genu N rekombinacja w rejonie translokacji jest jednak możliwa. Lewis i in. (36) oraz Lewis i Rose (34) wykazali ponadto małe prawdopodobieństwo, że gen N jako taki wywiera negatywny wpływ na plon lub inne cechy użytkowe tytoniu, czyli że w przypadku tego genu oddziaływanie plejotropowe nie ma praktycznego znaczenia. Konkluzja zawarta w przytoczonych pracach była taka, że negatywny wpływ genu N należy przypisać głównie obecności obcej chromatyny wniesionej wraz z genem N oraz że strategie hodowlane ukierunkowane na zmniejszenie ilości tej obcej chromatyny mają szanse powodzenia.

### Potencjalne alternatywne rozwiązania problemu odporności na mozaikę tytoniu

*N. glutinosa* nie jest jedynym gatunkiem wykazującym odporność na wirusa TMV typu nadwrażliwości. Odporność tego typu wykryto u trzynastu innych gatunków rodzaju (15, 56). Stavely (47) wymienia jeszcze 9 innych gatunków *Nicotiana* jako odpornych na TMV, nie precyzując charakteru odporności.

Istnieje kilka doniesień na temat prób wykorzystania niektórych z tych gatunków jako źródeł odporności na TMV u tytoniu. O uzyskaniu roślin odpornych na mozaikę tytoniu w potomstwie mieszańca *N. glauca* × *N. tabacum* donosił Berbeć (6). Palakarcheva (41) i Dorossiev i in. (16) poinformowali o przeniesieniu odporności na TMV z gatunków *N. goodspeedii* i *N. sanderae*. Gwynn i in. (23) przenieśli odporność na TMV z gatunku *N. repanda* do *N. tabacum*, ale uzyskane linie hodowlane tytoniu wykazywały niestabilne dziedziczenie. Wszystkie te doniesienia łączy brak

informacji na temat dalszego wykorzystania uzyskanych materiałów hodowlanych oraz, z wyjątkiem opracowania Gwynna i in. (23), brak szczegółów dotyczących przebiegu samego transferu odporności do gatunku uprawnego.

Depta i in. (15) odkryli unikalną właściwość odporności na TMV u gatunku *N. gossei* polegającą na braku zależności czynnika odporności od temperatury otoczenia. Wykazali ponadto, że cecha odporności na mozaikę u *N. gossei* nie jest determinowana genem N i jest oparta na odrębnym mechanizmie odporności. Wcześniej Palakarcheva i in. (42) podali, że reakcja nadwrażliwości na wirus TMV od *N. gossei* ulega ekspresji w bezpłodnym mieszańcu  $F_1$  *N. gossei*  $\times$  *N. tabacum*, a także w płodnych regenerantach wyprowadzonych z tego mieszańca, co dobrze rokuje w przypadku podjęcia próby przeniesienia tej odporności do tytoniu szlachetnego.

Radykalnym sposobem uniknięcia niepożądanych skutków odporności od *N. glutinosa* jest zastosowanie genu N w formie „czystej”. Gen N był pierwszym sklonowanym roślinnym genem warunkującym odporność (55). Jest on obecnie używany zarówno w transformacji tytoniu, jak i pomidora (33). Istnieją także transgeniczne odmiany, w których odporność polega na powszechnie znanej metodzie transformacji genem białka płaszczka wirusowego oraz alternatywne formy, w których odporność warunkowana jest przez replikację wirusową (8). Praktyczne zastosowanie transformacji genetycznej w hodowli tytoniu jest jednak obecnie niemożliwe z uwagi na opór producentów wyrobów tytoniowych, a także na koszty związane z prawami własności intelektualnej (35). Lewis i in. (36) zwracają jednak uwagę na to, że sam proces transformacji może także przynosić negatywne i uciążliwe do usunięcia skutki, głównie w wyniku mutagennego działania kultur tkankowych będących składnikiem tej metody.

### **Hodowla odmian typu Virginia odpornych na mozaikę tytoniu**

Zamieszczone wcześniej uwagi na temat szkodliwych sprzężeń i negatywnego wpływu czynnika N z *N. glutinosa* na wartość użytkową odmian tytoniu niemal w całości odnoszą się do tytoniu suszonego ogniowo-rurowo, czyli typu Virginia. U tytoni suszonych powietrznie, w szczególności u odmian w typie Burley, ujemne efekty nie są obserwowane (25). W obrębie typu Virginia porównanie wyjściowych odmian podatnych z ich izogenicznymi odpowiednikami posiadającymi gen N od *N. glutinosa* wykazało znaczne zmniejszenie plonu u linii odpornych (10, 11, 34, 36), a także negatywny wpływ na cechy jakościowe (10, 11). Wyniki ścisłych porównawczych prac badawczych, skądinąd niewiele, potwierdza jednak praktyka plantatorska. O ile odmiany w typie Burley odporne na mozaikę tytoniu są powszechnie akceptowane, to akceptacja odmian Virginii odpornych na mozaikę jest niewielka (36). Wykazano, że negatywny wpływ czynnika odporności na TMV na wartość użytkową tytoniu Virginia ulega wydatnemu osłabieniu, jeśli czynnik ten jest w stanie heterozygotycznym, co ma miejsce w odmianach mieszańcowych, z których tylko jeden z komponentów rodzicielskich jest nośnikiem odporności (11, 34). Stąd też



wprowadzane do uprawy odmiany odporne są wyłącznie odmianami mieszańcowymi opartymi na systemie cytoplazmatycznej męskiej sterility.

Mimo że aktualnie dostępne odmiany tytoniu Virginia odporne na mozaikę tytoniu wciąż posiadają liczne wady, ich uprawa w niektórych okolicznościach może być jak najbardziej uzasadniona. Ma to miejsce, kiedy według oceny plantatora przewidywane straty w dochodzie z uprawy tytoniu wywołane przez uprawę odmiany odpornej będą niższe niż potencjalny spadek dochodu z uprawy odmiany podatnej, który można przypisać występowaniu mozaiki na jego polu. Johnson i Main (28) podają, że występowanie mozaiki u ponad 1/3 roślin na polu uzasadnia zastąpienie odmiany podatnej odporną. Zalecenia agrotechniczne dla plantatorów tytoniu Virginia w USA opublikowane w roku 2019 (1) podają charakterystykę 37 odmian, z których 9, czyli blisko ¼ posiada odporność na wirusa TMV. Innym powodem przemawiającym za sensownością wprowadzania do uprawy odmian odpornych na mozaikę jest fakt, że niektórzy kupujący oczekują surowca tytoniowego, który daje gwarancję, że jest wolny od wirusa TMV. Uprawa odmiany odpornej praktycznie w pełni spełnia to oczekiwanie, aczkolwiek teoretycznie nie jest to zabezpieczenie absolutne. Odporność na TMV warunkowana genem *N* od *N. glutinosa* ma charakter nadwrażliwości, tzn. blokuje rozprzestrzenianie się wirusa w roślinie poprzez gwałtowne zamieranie komórek w miejscu infekcji (27). Mechanizm nadwrażliwości ma tę właściwość, że przestaje być skuteczny w temperaturach powyżej 32°C (43). Okresy upalnej pogody zdarzają się w Polsce ostatnio nawet częściej niż dawniej. Niemniej jednak autor tych rozważań w latach 2020 i 2021 na ponad tysiąc obserwowanych roślin z genem *N* wystawionych na silną naturalną i dodatkowo sztucznie wspomaganą presję TMV (infekcja od 90 do 100% roślin w obrębie odmian podatnych) zaobserwował wystąpienie jedynie 1 rośliny wykazującej objawy mozaiki tytoniu. Można zatem przewidywać, że w normalnych warunkach uprawy odmian Virginii z czynnikiem nadwrażliwości na wirusa TMV sporadyczne przypadki załamania odporności u pojedynczych roślin nie będą miały istotnego wpływu na stan fitosanitarny plantacji i zebranego surowca, szczególnie jeśli jednocześnie przestrzegane będą rutynowe zalecenia ochrony przed tą chorobą.

## **Aktualny stan prac nad hodowlą odmian odpornych na mozaikę w Polsce**

### **Uwagi wstępne**

W Polsce nie prowadzono hodowli tytoniu w kierunku odporności na mozaikę tytoniu. Od ponad 20 lat uprawiane są natomiast zagraniczne odmiany w typie Burley odporne na tę chorobę, w tym amerykańska odmiana TN-90. Brak w krajowym asortymencie odmian tytoniu Virginia odpornych na TMV wydawał się zatem luką, którą należałoby uzupełnić. W związku z tym w drugiej połowie ubiegłej dekady podjęto w IUNG-PIB próbę wyhodowania użytkowej odmiany tytoniu Virginia odpornej na

TMV. Przeniesienie genu od podstaw z obcego gatunku do formy uprawnej metodą tradycyjną, tj. przez wytworzenie mieszańca międzygatunkowego i krzyżowania wsteczne, jest procesem żmudnym i długotrwałym. Nawet u tytoniu, u którego bardzo wysoki współczynnik rozmnażania wydatnie wspomaga tempo procesu hodowlanego, czasokres hodowli od pierwszego krzyżowania międzygatunkowego do użytkowej formy uprawnej może rozciągać się na dekady. Dlatego w dalszej części opracowania opisano próbę wykorzystania dostępnych materiałów wyjściowych, w których gen warunkujący odporność na mozaikę tytoniu był już zintegrowany z genomem *N. tabacum*.

### Próba wyhodowania odmiany użytkowej typu Virginia

Na przełomie XX i XXI w. prowadzono w IUNG-PIB program hodowlany mający na celu uzyskanie odmian tytoniu Virginia odpornych na czarną zgniliznę korzeni powodowaną przez grzyb *Thielaviopsis basicola* (syn. *Chalara elegans*). W części tego programu wykorzystano amerykańską odmianę TN 90 w typie użytkowym Burley jako źródło odporności na czarną zgniliznę. W wyniku krzyżowania i selekcji w obrębie potomstw mieszańcowych wyprowadzonych ze skrzyżowania TN 90 z polską odmianą Virginii Wiślica uzyskano kilkadziesiąt linii hodowlanych tytoniu morfologicznie zbliżonych do Wiślicy odpornych na czarną zgniliznę. W związku z rosnącym zagrożeniem plantacji tytoniowych w Polsce mozaiką tytoniu i z uwagi na to, że występująca w rodowodzie tych linii odmiana TN-90 posiada czynnik odporności na wirusa TMV (38), postanowiono kilka lat temu przebadać wcześniej uzyskane linie pod względem odporności na tę drugą chorobę. We wspomnianym wyżej programie hodowlanym prowadzono wyłącznie selekcję na odporność względem czarnej zgnilizny korzeni. Z uwagi na to, że dwa geny odporności, których nośnikiem jest odmiana TN 90 – na czarną zgniliznę korzeni od *N. debneyi* i na wirusa TMV od *N. glutinosa* (39) – dziedziczą się niezależnie, szansa na znalezienie wśród tych linii (pokolenie BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub>) również takich z utrwaloną czy chociażby segregującą odpornością na mozaikę była bardzo niewielka. Niemniej jednak aż w sześciu z tych populacji BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub> fenotypowo zbliżonych do typu wypierającej odmiany Wiślica i odtworzonych z kilkunastoletnich materiałów nasiennych stwierdzono, obok odporności na czarną zgniliznę korzeni, występowanie reakcji nadwrażliwości na wirusa TMV charakterystycznej dla odmiany TN 90. U dwóch z tych populacji stwierdzono stabilne dziedziczenie, u czterech pozostałych występowała segregacja względem czynnika odporności na TMV. Dwie populacje ustalone i jedna segregująca dały początek trzem liniom hodowlanym i ich mieszańcom z cytoplazmatycznie męskosterylną formą odmiany Wiślica będących przedmiotem wstępnego polowego doświadczenia ścisłego nad przydatnością użytkową nowo otrzymanych form tytoniu Virginia odpornych na mozaikę tytoniową.

## Wstępna ocena połowa wartości użytkowej trzech odmian mieszańcowych tytoniu Virginia odpornych kompleksowo na mozaikę tytoniu, czarną zgniliznę korzeni i brunatnienie nerwów tytoniu na tle komponentów rodzicielskich i dwóch wariantów odmiany wzorcowej

### Obiekty i metody doświadczenia

#### *Obiekty doświadczenia*

- a) trzy linie hodowlane (WP 7, WP 9 i WP 10) uzyskane na drodze selekcji rodowodowej ze skrzyżowania odmiany Wiślica (typ użytkowy Virginia) z odmianą TN 90 (typ użytkowy Burley). WP 7, WP 9 i WP 10 są odporne na mozaikę tytoniową, czarną zgniliznę korzeni i pospolity szczep wirusa PVY powodujący brunatnienie nerwów liści;
- b) trzy odmiany mieszańcowe, czyli mieszańce  $F_1$  (pierwszego pokolenia) pochodzące ze skrzyżowania powyższych linii (WP 7, WP 9 i WP 10) z cytoplazmatycznie męskosterylnym analogiem odmiany Wiślica (Wiślica cms) jako formą mateczną. Są to odpowiednio:  $F_1$  Wiślica cms  $\times$  WP 7 (VRG 12),  $F_1$  Wiślica cms  $\times$  WP 9 (VRG 11) i  $F_1$  Wiślica cms  $\times$  WP 10 (Wismoza);
- c) dwa obiekty kontrolne: (I) Wiślica cms – cytoplazmatycznie męskosterylny analog odmiany Wiślica; (II) odmiana Wiślica (męskopłodna). Oba warianty Wiślicy są podatne na czarną zgniliznę korzeni i mozaikę tytoniową oraz odporne na nekrotyczny szczep wirusa Y.

#### *Metodyka doświadczenia*

Doświadczenie założono u plantatora tytoniu w gminie Markuszów w roku 2021 na wydzielonym miejscu pola produkcyjnego tytoniu w ramach dotacji celowej przyznanej IUNG-PIB.

Rozsadę do doświadczenia wyprodukowano w tunelu produkcyjnym metodą tac wielokomorowych wypełnionych substratem torfowym, umieszczonych na podłożu z piasku.

Doświadczenie założono metodą losowanych bloków w trzech powtórzeniach na glebie biellicowej, klasy V, na polu z historią kilkuletniej monokultury tytoniowej. Rośliny posadzono w zagęszczeniu ok. 23 000 roślin na 1 ha. Wielkość poletka wynosiła 8,5 m<sup>2</sup>, liczba roślin posadzonych na poletku – 20.

W uprawie zastosowano obecnie zalecaną agrotechnikę dla tytoniu Virginia (nażożenie mineralne, uprawa międzyrzędowa, środki ochrony roślin), z pominięciem ogławiania roślin.

W okresie wegetacji dokonano obserwacji tempa rozwoju roślin (początek kwitnienia), wysokości roślin i liczby liści użytkowych, a także wykonano pomiary biometryczne ósmego liścia od dołu rośliny (długość i szerokość). Na podstawie wysokości i liczby liści oszacowano średnią długość międzywęzła, dzieląc pierwszą wartość przez

drugą. Na podstawie stosunku szerokości do długości liścia oszacowano tzw. indeks szerokości liścia. Powierzchnię liścia oszacowano z iloczynu szerokości i długości liścia pomnożonego przez współczynnik 0,68. Podstawą danych biometrycznych była średnia z 10 roślin na poletku.

Przeprowadzono obserwacje chorób występujących na poletku w znaczącym nasileniu: zgnilizny podstawy łodyg (główny sprawca grzyb *Botrytis cinerea*), rizoktoniozy liści tytoniu (plamistości przestrzelinowej) wywołanej przez grzyb *Thanatephorus cucumeris* i brunatnienia nerwów liści wywołanego przez nekrotyczny izolat/izolaty wirusa PVY. Dla zgnilizny podstawy łodyg i brunatnienia nerwów liści stopień porażenia określono na każdym poletku na podstawie stosunku liczby roślin wykazujących objawy chorobowe do całkowitej liczby roślin. Porażenie przez rizoktoniozę określono na podstawie własnej skali od 0 do 5, gdzie: 0 – brak objawów, 1 – objawy sporadyczne (do 5% roślin porażonych, sporadyczne plamy na dolnych liściach), 2 – słabe porażenie (do 10% roślin porażonych, słabe nasilenie plam na liściach głównie dolnych, 3 – średnie porażenie (do 25% roślin porażonych, u ponad połowy z nich – dużo plam na dolnych liściach i sporadycznie na liściach środkowych), 4 – silne porażenie (do 50% roślin porażonych, u ponad połowy z nich – dużo plam na dolnych i środkowych liściach, sporadycznie na górnych), 5 – bardzo silne porażenie (ponad 50% roślin porażonych, na ponad połowie z nich dużo plam na całych roślinach).

Przeprowadzono cztery zbiory liści w miarę dojrzewania kolejnych pięter. Zebrane liście suszono w suszarni kontenerowej w reżymie wilgotnościowo-temperaturowym dla tytoniu Virginia. Oznaczono plon wysuszonych liści z poszczególnych zbiorów i poletek. Ze względu na wypadnięcia roślin związane z występowaniem choroby podstawy łodygi we wczesnej fazie wzrostu uzyskane plony z poletek poddano konwersji z uwzględnieniem współczynnika wypadów (stosunek liczby roślin posadzonych do liczby roślin w momencie rozpoczęcia zbiorów). Tak obliczoną masę plonu i pozostałe parametry plonu przeliczono na 1 ha. Ocena plonu obejmowała następujące parametry:

- a) masę wysuszonych liści (plon całkowity);
- b) procentowy udział poszczególnych klas wykupowych (od I do VI) w całkowitym plonie;
- c) wartość brutto plonu (w zł) wyliczoną na podstawie cennika dla poszczególnych klas wykupowych stosowany przez jednego z głównych podmiotów skupujących tytoń;
- d) średnią wartość 1 kg plonu (w zł);
- e) indeks jakości plonu – skumulowany ważony wskaźnik wyrażający w jednej wartości liczbowej strukturę jakościową (udział poszczególnych klas) plonu. Wartość indeksu obliczono według następującego wzoru:

$$\text{Indeks jakości plonu} = [(masa\ klasy\ I \times 1,0) + (masa\ klasy\ II \times 0,85 \times masa\ klasy\ III \times 0,7) + (masa\ klasy\ IV \times 0,5 + masa\ klasy\ V \times 0,1) + (masa\ klasy\ VI \times 0,0)] / \text{całkowita\ masa\ plonu}$$

Pobrano próby liści ze wszystkich pięter zbioru i oznaczono metodą wysoko-sprawną chromatografi gazowej zawartość nikotyny w zbiorczej próbie dla każdego poletka.

Uzyskane dane eksperymentalne poddano analizie wariancji dla modelu losowanych bloków. W przypadku odrzucenia hipotezy zerowej obliczono wartość najmniejszej różnicy dla wielokrotnych porównań za pomocą testu HSD Tukeya.

## Wyniki

### *Występowanie ważniejszych patogenów na badanych obiektach (tab. 1)*

W okresie wegetacji w polu mozaika tytoniu wystąpiła w bardzo słabym nasileniu (kilka chorych roślin na całym doświadczeniu na obiektach podatnych). W znaczącym nasileniu wystąpiły takie choroby, jak: zgnilizna podstawy łodyg, rizoktonioza liści tytoniu, brunatnienie nerwów liści i zgnilizna twardzikowa (tab. 1).

Tabela 1

Występowanie głównych chorób tytoniu na odmianach tytoniu Virginia i ich liniach rodzicielskich uzyskanych na bazie odmiany Wiślica, łączących cechy odporności na czarną zgniliznę korzeni, mozaikę tytoniu i brunatnienie nerwów liści tytoniu. Wola Przybysławska 2021

Nazwa obiektu	Zgnilizna podstawy łodyg (% roślin porażonych)	Rhizoktonioza liści tytoniu przez grzyb <i>Thanatephorus cucumeris</i> (średnia ocena w skali 0–5)*	Brunatnienie nerwów liści (% roślin porażonych)
Wiślica cms (kontrola I)	3,3	3,3	22,4
WP 7	21,7	2,3	6,3
WP 10	5,0	3,0	8,5
WP 9	16,7	2,7	8,9
Wiślica cms x WP 10 (Wismoza)	21,7	3,0	18,8
Wiślica cms x WP 9 (VRG 11)	16,7	3,3	12,1
Wiślica cms x WP 7 (VRG 12)	16,7	3,3	24,0
Wiślica (kontrola II)	20,0	2,7	4,1
HSD	nieistotna	**	17,37

\*prowizoryczna skala intensywności porażenia roślin ułożona przez autora opracowania. Szczegóły na stronie 19

\*\*analizy statystycznej nie przeprowadzono z uwagi na prowizoryczność skali i prawdopodobnie dużą subiektywność oceny

Źródło: opracowanie własne

**Zgnilizna podstawy łodyg** wystąpiła w dużym nasileniu bezpośrednio po posadzeniu roślin i wywołała liczne ich wypadanie. Głównym sprawcą choroby był grzyb *Botrytis cinerea*, lecz nie można było wykluczyć współdziałania grzyba *Rhizoctonia solani*, wegetatywnego stadium *Thanatephorus cucumeris*, który wywołał masowe porażenie liści tytoniu w późniejszym okresie. Na dwóch obiektach Wiślica cms i linia WP 10 stwierdzono porażenie zgnilizną podstawy łodyg wyraźnie niższe (w przypadku linii WP 10 co najmniej trzykrotnie, a u Wiślicy cms nawet pięciokrotnie) niż na pozostałych obiektach, lecz analiza wariancji nie potwierdziła istotności tych różnic. Wynikało to prawdopodobnie z wysokiej zmienności międzyblokowej stopnia porażenia zgnilizną podstawy łodyg na badanych obiektach.

**Rhizoctonioza tytoniu (plamistość przestrzelinowa) wywołana przez *T. cucumeris*, bazydiosporialne stadium *R. solani*.** Pierwsze widoczne objawy rizoctoniozy pojawiły się na dolnych liściach i były notowane jako wywołane przez chwościk tytoniowy (*Cercospora* sp.). Masowe pojawienie się brunatnych plam przypisano początkowo porażeniu przez grzyb *Alternaria alternata* wywołujący brunatną plamistość liści tytoniu. Dopiero wejście choroby w zaawansowane stadium pozwoliło ją zidentyfikować jako wywołaną przez *T. cucumeris*. Choroba wystąpiła w średnim natężeniu na wszystkich obiektach i na wszystkich poletkach doświadczenia. Nie stwierdzono istotnych różnic w porażeniu przez *T. cucumeris* między poszczególnymi obiektami doświadczenia, przypuszczalnie ze względu na dużą zmienność w wartości tego parametru w obrębie doświadczenia.

**Brunatnienie nerwów liści wywołane przez nekrotyczny szczep/szczepy wirusa Y ziemniaka.** Wśród obiektów obserwowanych w doświadczeniu jedynym czynnikiem wyraźnie różnicującym reakcję na wirus Y ziemniaka był typ cytoplazmy. W obiektach z roślinami męskopłodnymi (z cytoplazmą formy uprawnej *N. tabacum*), tj. Wiślicy i linii WP 7, WP 9 i WP 10, procentowy udział roślin wykazujących objawy zakażenia wirusem PVY był znacznie niższy w obiektach męskosterylnych z cytoplazmą obcego gatunku, tj. u Wiślicy cms i mieszańcach F<sub>1</sub>. Test HSD potwierdził istotność tych różnic między Wiślicą i Wiślicą cms oraz Wiślicą i mieszańcem VRG 12, a także między linią WP 7 i mieszańcem VRG 12. W pozostałych przypadkach różnice te, aczkolwiek znaczne, były nieistotne.

### ***Tempo wzrostu i wybrane cechy morfologiczne badanych linii ustalonych i mieszańców (tab. 2)***

**Długość okresu czasu od posadzenia do początku kwitnienia.** Średnie obiektowe liczby dni od wysadzenia w polu do początku kwitnienia wykazywały słabe zróżnicowanie i wynosiły od 63,4 dnia u odpornej na mozaikę linii WP 10 do 66,8 dni u mieszańca VRG 12. Występujące różnice międzyobektowe były poniżej progu istotności określonego testem HSD Tukeya.

Tabela 2

Tempo rozwoju i wybrane cechy morfologiczne mieszańcowych odmian tytoniu Virginia i ich linii rodzicielskich uzyskanych na bazie odmiany Wiślica, łączących cechy odporności na czarną zgniliznę korzeni, mozaikę tytoniu i brunatnienie nerwów liści tytoniu (TMV).

Wola Przybysławska 2021

Nazwa obiektu	Dni do kwitnienia	Wysokość rośliny (cm)	Liczba liści (cm)	Długość 8. liścia (cm)	Szerokość 8. liścia (cm)	Indeks liścia (szerokość/długość)	Powierzchnia liścia (cm <sup>2</sup> )	Długość międzywęźli (cm)
Wiślica cms (kontrola I)	65,9	166,4	19,9	55,3	36,3	0,66	1311,2	8,40
WP 7	64,7	161,1	20,0	52,5	34,3	0,65	1175,4	8,08
WP 10	63,4	166,7	19,7	54,1	35,4	0,64	1270,2	8,50
WP 9	67,5	169,5	20,3	53,6	33,9	0,63	1181,5	8,36
Wiślica cms x WP 10 (Wismoza)	65,9	169,4	20,1	56,6	36,9	0,65	1361,0	8,46
Wiślica cms x WP 9 (VRG 11)	64,9	170,7	20,4	56,5	35,7	0,63	1315,5	8,37
Wiślica cms x WP 7 (VRG 12)	66,8	164,3	20,1	54,7	35,5	0,65	1270,8	8,18
Wiślica (kontrola II)	66,1	165,5	20,7	54,5	35,5	0,65	1265,4	8,03
HSD	nieistotna	5,05	0,89	nieistotna	nieistotna	nieistotna	nieistotna	0,425

Źródło: opracowanie własne

**Wysokość roślin.** Średnie obiektowe pokazały dość znaczne różnice tej cechy między badanymi liniami odpornymi, ich mieszańcami z cytoplazmatycznie męskosterylnym analogiem odmiany Wiślica i męskopłodną odmianą Wiślica. Najwyższym obiektem doświadczenia była odmiana mieszańcowa VRG 11. Istotnie niższymi od VRG 11 były VRG 12 i jej rodzic ojcowski – linia WP 7.

**Liczba liści.** Zróżnicowanie średniej liczby liści u badanych obiektów było niewielkie. Jedyna istotna różnica wystąpiła między obiektem o najwyższej i najniższej liczbie liści, tj. Wiślicą (7, 20) a linią WP 7 (7, 19).

**Rozmiary liścia środkowego (długość, szerokość, stosunek długości do szerokości i powierzchnia).** Średnia długość liścia środkowego wahała się od 52,5 cm u linii WP 7 do 56,6 cm u mieszańca Wismoza. Różnice te były niższe niż wartość testu HSD dla tego parametru. Podobnie brak istotnych różnic między badanymi obiektami stwierdzono dla szerokości, długości i powierzchni liścia środkowego, a także stosunku szerokości do długości (indeksu) ósmego liścia na roślinie.

**Długość międzywęzła.** Istotne zróżnicowanie pomiędzy niektórymi obiektami stwierdzono w przypadku odstępu między kolejnymi liśćmi na roślinie. Średnio najkrótsze międzywęzła miała Wiślica (8,03 cm). Istotnie dłuższe międzywęzła niż Wiślica wykształciły Wismoza i forma ojcowska tego mieszańca – linia WP 10. Ta ostatnia linia miała najdłuższe międzywęzła (8,50 cm) spośród obiektów doświadczenia.

### **Charakterystyka elementów plonowania badanych obiektów (tab. 3)**

**Plon wysuszonych liści.** Plony obiektów porównywanych w doświadczeniu oscylowały w okolicy  $3,3 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$  i tylko w przypadku linii WP 7 i WP 9 (odpornych na TMV rodziców męskich odmian mieszańcowych VRG 12 i VRG 11) były znacznie poniżej tej wartości (odpowiednio:  $2,49$  i  $2,62 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ ). Wszystkie różnice międzyobektowe były jednak poniżej wartości najmniejszej istotnej różnicy dla tego parametru.

**Skumulowany udział klas I i II oraz I, II i III w plonie liści.** Nie wykazano istotnych różnic w łącznym udziale klas I i II w plonie liści między badanymi obiektami, pomimo że różnice w średnich wartościach tego parametru były znaczne (od  $50,3\%$  dla VRG 12 do  $29,5\%$  dla Wismozy). U większości obiektów udział I i II klasy wynosił nieco poniżej  $50\%$ . Istotne różnice między niektórymi obiektami wystąpiły natomiast w łącznym procentowym udziale klas I, II i III. Najwyższym procentowym udziałem klas od I do III w plonie charakteryzowała się Wiślica cms ( $93,3\%$ ) i jej męskopłodny analog, a istotnie niższym – dwie wyprowadzone z Wiślicy linie odporne na mozaikę tytoniową: linia WP 7 i linia WP 9. Ta ostatnia linia wydała plon liści o najniższym udziale klas od I do III, przy czym istotnie wyższy udział tzw. klas jasnych stwierdzono jedynie dla Wiślicy, Wiślicy cms i VRG 12.



Tabela 3  
 Charakterystyka plonowania mieszanych odmian tytoniu Virginia i ich linii rodzicielskich uzyskanych na bazie odmiany Wiślica, łączących cechy odporności na czarną zgniliznę korzeni, mozaikę tytoniu (TMV) i brunatnienie nerwów liści tytoniu. Wola Przybyłowska 2021

Nazwa obiektu	Plon (t·ha <sup>-1</sup> )	Indeks jakości plonu**	Wartość jednostkowa (zł·kg <sup>-1</sup> )	Udział I-II klasy (%)	Udział I-III klasy (%)	Wartość plonu (zł·ha <sup>-1</sup> )	Średnia zawartość nikotyny w wysuszonych liściach (%)
Wiślica cms (kontrola I)	3,17	0,80	12,18	38,8	93,3	36654,0	1,28
Linia WP 7	2,49	0,65	10,31	47,6	55,9	25354,7	0,84
Linia WP 10	3,06	0,71	10,40	50,0	63,0	33617,5	1,33
Linia WP 9	2,62	0,65	9,77	46,2	48,2	26238,2	0,78
Wiślica cms x WP 10 (Wismoza)	3,24	0,69	10,00	29,5	64,9	32831,4	1,13
Wiślica cms x WP 9 (VRG 11)	3,28	0,70	10,70	49,4	77,4	39145,6	0,98
Wiślica cms x WP 7 (VRG 12)	2,85	0,75	10,50	50,3	87,8	35801,8	1,02
Wiślica (kontrola II)	2,90	0,72	10,91	43,4	90,6	37320,4	1,30
HSD	nieistotna	nieistotna	nieistotna	nieistotna	35,95	nieistotna	0,313

Źródło: opracowanie własne

**Indeks jakości plonu i jednostkowa wartość brutto plonu.** Indeks jakości plonu w badanych obiektach był dość zróżnicowany – od 0,80 w przypadku Wiślicy cms do 0,65 w przypadku linii WP 9. Zróżnicowane to było jednak mniejsze niż wartość HSD wyliczona dla tego parametru. Porównując różnice między obiektami, uzyskane wartości jednostkowe plonu układały się podobnie jak wartości wyliczonego indeksu jakości. Również w przypadku wartości 1 kg plonu nie stwierdzono istotnych różnic międzyobiektywych.

**Wartość plonu brutto z 1 ha uprawy.** Parametr ten stanowi dla plantatora często najistotniejszą cechę stanowiącą o opłacalności uprawy. Dla poszczególnych obiektów wyliczony dochód przybierał wartość od nieco ponad 25 tys. PLN (linia WP 7) do ponad 39 tys. PLN (mieszaniec VRG 11). Można też zauważyć, że komponent ojcowski tego mieszańca – linia WP 9, dała obok linii WP 7 jeden z dwóch najniższych dochodów w doświadczeniu. Obiektami, które dały najwyższy dochód brutto z jednostki powierzchni były, obok mieszańca VRG 11, obie Wiślice i mieszaniec VRG 12 pochodzący ze skrzyżowania Wiślicy cms z linią WP 7. Różnice w uzyskanym dochodzie z poszczególnych obiektów, pomimo że liczbowo wyraźne, nie zyskały potwierdzenia w analizie statystycznej.

**Zawartość nikotyny w plonie.** Najwyższą zawartość nikotyny w wysuszonych liściach stwierdzono u linii WP 10. Istotnie mniej nikotyny zawierały liście VRG 12, VRG 11, WP 7 i WP 9. Ta ostatnia linia zawierała najmniej nikotyny i istotnie przewyższała ją pod tym względem Wismoza, Wislica cms, Wiślica i linia WP 10.

## Dyskusja

Przytoczone tu wyniki wstępnego testu w warunkach polowych pierwszych krajowych kreacji tytoniu Virginia odpornych na mozaikę tytoniową są obarczone bardzo dużym błędem wynikającym ze zmienności warunków wzrostu, co negatywnie wpłynęło na możliwości wnioskowania opartego na statystycznej analizie danych. Zmienność glebowa miała tu przypuszczalnie największy udział, ale bardzo duży wpływ wywarły także trudne warunki pogodowe, przede wszystkim niskie temperatury wiosną i wczesnym latem. Spowodowało to opóźnienie terminu sadzenia oraz wolny i nierównomierny wzrost w polu. Niemniej jednak uzyskane wyniki pozwoliły na pierwsze spostrzeżenia dotyczące wartości użytkowej tych materiałów.

Badane linie wsobne i mieszańce  $F_1$  łączą odporność na TMV z odpornością na dwie inne choroby tytoniu powszechnie występujące w Polsce: czarną zgniliznę korzeni i pospolite nekrotyczne izolaty wirusa Y ziemniaka. Wszystkie trzy odporności są kontrolowane pojedynczymi genami warunkującymi odporność typu wertrykalnego, przy czym odporność na TMV i *T.basicola* warunkują geny dominujące (13, 32, 33, 35), a odporność na PVY warunkuje recesywny allel/allele genu *va* (38). Wcześniejsze badania wykazały, że zarówno w przypadku odporności na TMV, jak i na *T. basicola* negatywne skutki ulegają wydatnemu zmniejszeniu, jeśli czynnik

odporności występuje w stanie heterozygotycznym, czyli w formach mieszańcowych, w których ten czynnik wnosi tylko jeden z rodziców (24, 34). Stąd też zasadniczym przedmiotem badań były formy mieszańcowe, które oceniano na tle linii ojcowskich wnoszących odporność oraz odmiany matecznej (Wiślica) i jej analogów stanowiących obiekty kontrolne. Na potrzeby niniejszej dyskusji należy podkreślić, że badane linie i mieszańce pod względem typu morfologicznego były bardzo zbliżone do odmiany Wiślica, przy zauważalnej odrębności pod tym względem linii WP 9. Odrębność tę, chociaż w mniejszym stopniu, zachował również mieszańiec  $F_1$  Wiślica cms  $\times$  linia WP 9 (VRG 11). Znalazło to pewne potwierdzenie w nieco wyższych roślinach obu form w stosunku do pozostałych, z wyjątkiem mieszańca Wismoza (tab. 2).

Obserwowane w doświadczeniu porażenie roślin przez zgniliznę podstawy łodyg i rizoktoniozę liści (plamistość przestrzelinową) nie różniło się na poszczególnych obiektach, co dość łatwo wytłumaczyć ich dużym genetycznym podobieństwem. Wystąpiło natomiast dość wyraźne zróżnicowanie w reakcji na presję infekcyjną wywieraną przez wirus Y w zależności od typu cytoplazmy. Wszystkie badane w doświadczeniu obiekty posiadały genetyczną odporność typu *va*. Gen typu *va* występuje zarówno w Wiślicy, jak i TN 90 (38), dwóch odmianach wyjściowych w rodowodzie badanych form odpornych na mozaikę. Obiekty męskopłodne zawierały natywny genom cytoplazmatyczny *N. tabacum*, natomiast obiekty cytoplazmatycznie męskojąłowe posiadały obcą cytoplazmę, nominalnie od gatunku *N. quadrivalvis*, przypuszczalnie wywodzącą się od gatunku *N. suaveolens* (3). Na obiektach męskosterylnych notowano znacznie więcej roślin wykazujących objawy infekcji wirusem (chlorozy i nekrozy nerwów liści) niż na obiektach męskopłodnych. Obniżenie odporności na infekcję PVY na niektórych cytoplazmatycznych analogach odmiany Wiślica stwierdzili Berbeć i Laskowska (5). Czubačka i in. (14) potwierdzili wpływ obcej cytoplazmy na stopień tolerancji względem tego patogenu u odmiany tolerancyjnej. Według wcześniejszych obserwacji (5) typ cytoplazmy *quadrivalvis* vel. *bigelovii* nie obniżał odporności na PVY u Wiślicy albo obniżał ją w nieznacznym stopniu (u mieszańca  $F_1$  Wiślicy z inną odmianą) (4). W opisywanym tu doświadczeniu obserwowano obniżoną odporność na zakażenie wirusem Y ziemniaka u wszystkich obiektów cytoplazmatycznie męskosterylnych, chociaż istotność tego efektu nie została potwierdzona dla wszystkich porównań. Reakcja badanych obiektów przypomina znacznie zwiększoną podatność na PVY pod wpływem cytoplazmy *N. suaveolens* (4, 5), który to gatunek jest być może rzeczywistym dawcą systemu genetycznego warunkującego cytoplazmatyczną męską sterylność w obiektach omawianego tu doświadczenia. Powyższe rozbieżności można również tłumaczyć różnicą w izolatach PVY występujących w początkach ubiegłej dekady i obecnie.

Odnotowano niewiele istotnych różnic między badanymi obiektami pod względem cech morfologicznych. Uzyskane różnice trudno było powiązać z wpływem odporności na mozaikę. Również Chaplin i in. (11) oraz Chaplin i Mann (10) nie znaleźli

takich zależności z wyjątkiem istotnego ujemnego wpływu na wysokość roślin u jednej odpornej linii w porównaniu z jej podatnym izogenicznym odpowiednikiem (11).

Mimo dość znacznego zróżnicowania liczbowych wartości poszczególnych parametrów plonowania między obiektami, analiza statystyczna nie potwierdziła istotności tych różnic z dwoma wyjątkami – kumulowanego udziału trzech najwyższych klas wykupowych w plonie i w zawartości nikotyny. Najwyższy udział klas od I do III (tzw. klas jasnych) stwierdzono u dwóch form bez czynnika odporności na mozaikę (Wiślica cms i Wiślica) i jednego odpornego mieszańca (VRG 12). Plon o najniższym udziale klas jasnych wydały trzy linie homozygotyczne pod względem genu odporności. U heterozygotycznych mieszańców udział klas jasnych był pośredni. Jeżeli chodzi o łączny udział klas jasnych (o przewadze żółtego zabarwienia wysuszonych liści) w plonie, to wydaje się, że jest to najlepsza miara jakości, jako stosunkowo najmniej obciążona subiektywnością oceny przez klasyfikatora. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na negatywny wpływ genu odporności na mozaikę na wynik suszenia, co również już w początkach badań nad tym typem odporności u tytoniu Virginia podkreślali Chaplin i Mann (10). Omawiane tu wyniki mogą jednocześnie stanowić potwierdzenie opinii, że uboczne niepożądane skutki czynnika odporności na mozaikę ulegają znacznemu osłabieniu w stanie heterozygotycznym (11, 34). Lewis i Rose (34) nie stwierdzili ujemnego wpływu czynnika odporności na jakość Virginii i uznali obniżony plon za główny niepożądany efekt czynnika odporności w tym typie użytkowym. Wyniki uzyskane w omawianym doświadczeniu IUNG-PIB zdają się sugerować zależność odwrotną, tj. efekt negatywny na przebieg suszenia, a brak efektu na wysokość plonu. Z drugiej strony istotność tylko niektórych różnic dotyczących omawianego parametru została potwierdzona statystycznie. Lewis i in. (36) podają, że suma alkaloidów w liściach certyfikowanej aromatycznej Virginii K 326 była niższa niż u jej odpowiednika uodpornionego na mozaikę tytoniu. W naszych badaniach obserwowano tendencję do odwrotnej zależności, tj. obniżonej zawartości nikotyny w liniach i mieszańcach odpornych w stosunku do obiektów kontrolnych (Wiślica i Wiślica cms). Wyjątkiem była linia WG 10 i jej mieszańiec z Wiślicą (Wismoza), z zawartością nikotyny na poziomie zawartości u Wiślicy. U odbiorców surowca tytoniowego Wiślica cieszy się dobrą opinią, między innymi ze względu na względnie wysoką zawartość nikotyny w grupie odmian Virginia wykorzystywanych jako wypełniacze (ang. *fillers*). Stąd też Wismoza może znaleźć uznanie u odbiorców poszukujących tytoniu wypełniającego i jednocześnie wolnego od mozaiki. Należy także zauważyć, że badane ustalone linie odporne nie zostały doprowadzone do stanu izogenicznego, czy nawet choćby prawie izogenicznego względem odmiany Wiślica. A zatem niektóre z obserwowanych różnic mogły być wynikiem obecności, mniejszej lub większej, materiału genetycznego z odmiany TN 90 niezwiązanego z odpornością na mozaikę.

## Podsumowanie i wnioski

W opracowaniu przedstawiono wybrane aspekty hodowli tytoniu odpornego na mozaikę tytoniu powodowaną przez wirus TMV. We wstępie podano krótki opis poznania czynnika sprawczego choroby i znaczenia samej choroby. W pierwszych podrozdziałach poświęconych badaniom nad uzyskaniem tytoniu odpornego na mozaikę omówiono odporność wewnątrzgatunkową typu Ambalema i pierwsze próby hodowli międzygatunkowej polegającej na pozyskaniu odporności od gatunku *N. rustica*. Następne części poświęcono badaniom nad przeniesieniem odporności na TMV z gatunku *N. glutinosa* oraz badaniom nad mechanizmem odporności i barierami introgresji w przypadku tego czynnika odporności. Ostatnia część omawia wyniki uzyskane w IUNG-PIB w związku z pierwszymi próbami wyhodowania krajowych odmian tytoniu Virginia odpornych na mozaikę. W świetle uzyskanych jednorocznych wyników można ostrożnie stwierdzić, że uzyskane mieszańce F<sub>1</sub> tytoniu, pierwsze krajowe odmiany typu Virginia z odpornością na mozaikę tytoniu, nie różniły się istotnie od wzorcowej odmiany Wiślica i od jej cytoplazmatycznego analoga pod względem szybkości rozwoju, wybranych cech morfologicznych i masy uzyskanego plonu, a w przypadku mieszańca F<sub>1</sub> Wismoza, także zawartości nikotyny w liściach. Otrzymane wyniki wydają się jednak sugerować, że badane mieszańce F<sub>1</sub> i linie wsobne odporne na mozaikę mogą dawać gorszej jakości surowiec w porównaniu z wyjściowymi odmianami bez genu odporności. Na obecnym etapie trudno jest ustalić, w jakiej mierze za tymi ewentualnymi negatywnymi skutkami procesu hodowlanego stoi gen odporności na TMV wraz z wprowadzoną z nim sprzężoną obcą chromatyną, a w jakim stopniu odpowiedzialny jest rezydualny materiał genetyczny pochodzący od bezpośredniego dawcy odporności – odmiany TN 90.

## Literatura

1. 2019 Flue-cured tobacco guide. NC State University. College of Agriculture and Life Sciences, 2019.
2. A n o G., B l a n c a r d D., C a i l l e t a u B.: Mise au point sur la résistance récessive aux souches nécotiques du virus Y de la pomme de terre (PVY) présente chez *Nicotiana tabacum*. Annales du Tabac, 1995, **27**: 35-42.
3. B e r b e ć A., B e r b e ć T.: *Nicotiana* species as sources of cytoplasmic male sterility in tobacco breeding. CORESTA Congress, Kunming, 2018, Agronomy/Phytopathology Groups, APPOST 26.
4. B e r b e ć A., L a s k o w s k a D.: Agronomic performance of flue-cured tobacco F<sub>1</sub> hybrids obtained with different sources of male sterile cytoplasm. Beiträge zur Tabakforschung International, 2004, **21**: 235-239.
5. B e r b e ć A., L a s k o w s k a D.: Investigations of isogenomic alloplasmics of flue-cured tobacco *Nicotiana tabacum* cv. Wislica. Beiträge zur Tabakforschung International, 2005, **21**: 235-239.
6. B e r b e ć J.: Badania and krzyżówką *Nicotiana glauca* × *N. tabacum*. Inf PAN, 1966, **7-213**: 340.
7. B u r k L.G.: An interspecific bridge-cross – *Nicotiana repanda* through *N. sylvestris* to *N. tabacum*. J Hered, 1967, **58**: 215-218
8. C a r r P., Z a i t l i n M.: Replicase-mediated resistance. Seminars in Virology, 1993, **4**: 339-247.

9. Ch a p l i n F.: Effects of tobacco mosaic on flue-cured tobacco-resistant and susceptible cultivars. South Carolina. Experiment Station Bulletin, 1964, pp. 513.
10. Ch a p l i n J.F., M a n n T.J.: Evaluation of tobacco mosaic resistance factor transferred from burley to flue-cured tobacco. Journal of Heredity, 1978, **69**: 175-178.
11. Ch a p l i n J.F., M a t z i n g e r D.F., M a n n T.J.: Influence of the homozygous and heterozygous mosaic-resistance factor on quantitative character of flue-cured tobacco. Tobacco Science, 1966, **10**: 81-84.
12. C l a u s e n R.E., G o o d s p e e d T.H.: Interspecific hybridization in *Nicotiana*. II. A tetraploid glutinosa-tabacum hybrid, an experimental verification of Winge's hypothesis. Genetics, 1925, **10**: 278-284.
13. C l a y t o n E.E.: The study of resistance to the black root rot disease of tobacco. Tobacco Science, 1969, **13**: 30-37.
14. C z u b a c k a A., D e p t a A., D o r o s z e w s k a T.: Zróżnicowanie reakcji odpornościowej na wirus Y ziemniaka wśród alloplazmatycznych form tytoniu. Polish Journal of Agronomy, 2019, **39**: 27-34
15. D e p t a A., K u r s a K., D o r o s z e w s k a T., L a s k o w s k a D., T r o j a k - G o l u c h A.: Reaction of *Nicotiana species* and cultivars of tobacco to Tobacco mosaic virus and detection of the N gene that confers hypersensitive resistance. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 2018, **54**: 143-146. doi.org/10.17221/81/2017-CJGPB
16. D o r o s s i e v L., P a l a k a r c h e v a M., Y a n c h e v a A.: Application of *in vitro* methods in the development of disease resistant Oriental tobacco hybrids and lines. Genetics and breeding, 1990, **23**: 306-315.
17. D o r o s z e w s k a T., B e r b e é A., C z a r n e c k a D., K a w k a M.: Choroby i szkodniki tytoniu. Diseases and Pests of Tobacco. (red. Teresa Doroszevska), 2013, IUNG-PIB, Puławy, ss. 122.
18. G a j o s z.: Przeniesienie odporności na wirus brązowej plamistości pomidora (Tomato spotted wilt virus) z *Nicotiana alata* Link et Otto do tytoniu szlachetnego przez skrzyżowanie obu gatunków. Biul Inf Centr Lab Przem Tyton, 1981, **(1-2)**: 3-24.
19. G e r s t e l D.U.: Inheritance in *Nicotiana tabacum*. XVII. Cytogenetical analysis of glutinosa-type resistance to mosaic disease. Genetics, 1943, **28**: 533-556.
20. G e r s t e l D.U.: Transfer of the mosaic-resistance factor between H-chromosomes of *Nicotiana glutinosa* and *N. tabacum*. Journal of Agricultural Research, 1948, **76**: 219-223.
21. G e r s t e l D.U., B u r k L.G.: Controlled introgression in *Nicotiana*. A cytological study. Tobacco Science, 1960, **4**: 147-150.
22. G o o d s p e e d T.H.: El tabaco y otras especies del genero *Nicotiana*. Bol. Fac. Agron. Vet. Buenos Aires, 1942, pp. 22.
23. G w y n n G.R., B a r k e r K.R., R e i l l y J.J., K o m m D.A.: Genetic resistance to tobacco mosaic virus, cyst nematodes, root-knot nematodes, and wildfire from *Nicotiana repanda* incorporated into *Nicotiana tabacum*. Plant Dis, 1986, **70**: 958-962.
24. H a j i H.M., M i s h a S., D e v o s M.: Host plant resistance management strategies for control of black root rot resistance. CORESTA Meeting Agro-Phyto Groups, Paris 2006, PPost 08.
25. H e g g e s t a d H.E., C l a y t o n E.E., N e a s M.O., S k o o g H.A.: Development of Burley 21, the first wildfire-resistant tobacco variety, including results of variety trials. University of Tennessee Agricultural Experiment Station Bul., 1960, pp. 321.
26. H o l m e s F.O.: Hereditary factors affecting tobacco-mosaic disease in solanaceous plants. Phytopathology, 1937, **27**: 131-132.
27. H o l m e s F.O.: Inheritance of resistance to tobacco-mosaic disease in tobacco. Phytopathology, 1938, **28**: 553-561.
28. J o h n s o n C.S., M a i n C.E.: Yield/quality trade-offs of tobacco mosaic virus – resistant tobacco cultivars in relation to disease management. Plant Disease, 1983, **67**: 886-890.
29. J o h n s o n E.S., W o l f f M.F., W e r n s m a n E.A.: Marker-assisted selection for resistance to black shank disease in tobacco. Plant Disease, 2002, **86**: 1303-1309.

30. Kaznowski L.: Choroby tytoniu. Państwowy Instytut Wydawnictw Rolniczych. Warszawa, 1949.
31. Kostoff D., Georgieva R.: Resistance to tobacco mosaic virus. II. Inheritance of necrotic reactions and plant breeding value of the strains *Nicotiana tabacum* var. *Virii*. Cent. Agric. Exp. Contr. Inst., Sofia, Bulgaria, 1938.
32. Legg P.D., Collins G.B., Litton C.C.: Effects of the N mosaic-resistance factor on agronomic and chemical traits in burley tobacco. *Crop Science*, 1979, **19**: 455-457.
33. Legg P.D., Litton C.C., Collins G.B.: Effects of N.debneyi black root rot resistance factor on agronomic and chemical traits of burley tobacco. *Theoretical and Applied Genetics*, 1981, **60**: 365-368.
34. Lewis R.S., Rose C.: Agronomic performance of tobacco mosaic virus-resistant tobacco lines and hybrids possessing the resistance gene N introgressed on different chromosomes. *Crop Science*, 2010, **50**: 1339-1347.
35. Lewis R.S., Milla S.R., Levin J.S.: Molecular and genetic characterization of *Nicotiana glutinosa* L. chromosome segments in tobacco mosaic virus-resistant tobacco accessions. *Crop Science*, 2005, **45**: 2355-2362.
36. Lewis R.S., Linger L.R., Wolff M.F., Wernsman E.A.: The negative influence of N-mediated TMV resistance on yield in tobacco: linkage drag versus pleiotropy. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, **115**: 169-178.
37. Malloch G.S.: Inheritance in *Nicotiana tabacum*. XVI. Structural differences among the chromosomes of a selected group of varieties. *Genetics*, 1943, **28**: 525-532.
38. Michel V., Julio E., Thierry C. et al.: A complex eIF4E locus impacts the durability of *va* resistance to Potato virus Y in tobacco. *Molecular Plant Pathology*, 2019, **20**: 1051-1056.
39. Miller R.D.: Registration of 'TN 90' Burley tobacco. *Crop Sci.*, 1991, **31**: 852.
40. Okah H.: A breeding study on interspecific transfer of disease resistance in tobacco. *Hatano Tobacco Expt. St. Bull.*, 1961, **49**.
41. Palakarcheva M.: Interspecific hybridization in the genus *Nicotiana*. *Bul. Spéc. CORESTA*, 1984, Congress Vienne, p. 142, abstr PP31.
42. Palakarcheva M., Staneva M., Tsanova E.: Hybridization between *Nicotiana gossei* Domin and *N. tabacum* L. for development of Oriental tobacco lines resistant to tobacco aphids and diseases. *Tobacco Science*, 1995, **39-2**: 38-42.
43. Richard C., Gilchrist D.: The hypersensitive response: A case of hold or fold. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1999, **55**: 5-12.
44. Rifkind D., Freeman L.: Tobacco Mosaic Virus. In: The Nobel Prize winning discoveries in infectious diseases, D. Rifkind and G.L. Freeman (eds). Academic Press, 2005, p. 81-84.
45. Schweenhauser M.A.: Interspecific bridge transfer in *Nicotiana* of resistance to *Meloidogyne javanica*. *South African Journal of Science*, 1974, **70**: 312-314.
46. Scholtz K.B.: Spicing Up the N Gene: F. O. Holmes and Tobacco mosaic virus Resistance in *Capsicum* and *Nicotiana* Plants. *Phytopathology*, 2017, **107**: 148-157
47. Staveley J.R.: Disease resistance. *Red. R. D. Durbin. Nicotiana. Procedures for experimental use*, 1979, p. 87-110.
48. Tiernowski M.F.: Dziedziczenie lokalizacji mozaiki w mieszańcach *Nicotiana glutinosa* L. × *N. tabacum*. [w j. rosyjskim: Sbornik issledowatelno-naucznych rabot WITIM], Krasnodar, 1938, **135**: 71-74.
49. Tiernowski M.F.: Metody hodowli odmian tytoniu odpornych na mozaikę i mączniak prawdziwy [w j. rosyjskim: Sbornik issledowatelno-naucznych rabot WITIM], Krasnodar, 1945, **143**: 126-141.
50. Tiernowski M.F.: Summary and prospects of interspecific hybridization in the genus *Nicotiana*. in: Wide hybridization of plants. *Proceedings of the Conference on Wide Hybridization of Plants and Animals; collection of reports*, 1962, Jerusalem, p. 331-345.

- 
51. T i e r n o v s k i M.F., Chudina J.P.: Reakcja mieszańców *Nicotiana glutinosa* × *N. tabacum* na mozaikę tytoniu [w j. rosyjskim: Sbornik issledowatelno-naucznych rabot WITIM], Krasnodar, 1938, **135**: 69-70.
  52. V a l l e a u W.D.: Control of the common mosaic disease by breeding. *Phytopathology*, 1942, **32**: 1022-1025.
  53. V a l l e a u W.D.: Breeding tobacco for disease resistance. *Economic Botany*, 1952, **6**: 69-102.
  54. V a n R e g e n m o r t e l M. H.V.: Tobacco Mosaic Virus. In: *Encyclopedia of Virology*, Academic Press, 2008, p. 54-60.
  55. W h i t h a m S., D i n e s h - K u m a r S.P., C h o i D., H e h l R., C o r r C., B a k e r B: The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: Similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, 1994, **78**: 1101-1115.
  56. Y u a n X., Y a n C h., W u Z., R e n F., Z h a n g H., B a k e r B., C h e n J., K u a n g H.: Frequent gain and loss of resistance against Tobacco mosaic virus in *Nicotiana species* (supplement). *Molecular Plant*, 2015, **8**: 1813-1815.
- 

Adres do korespondencji:

*prof. dr hab. Apoloniusz Berbec*  
*Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin*  
*IUNG-PIB*  
*ul. Czartoryskich 8*  
*24-100 Puławy*  
*tel. 81 4786 942*  
*e-mail: Apoloniusz.Berbec@iung.pulawy.pl*

---

AUTOR  
Apoloniusz Berbec

ORCID  
0000-0003-2021-4199





Grażyna Korbecka-Glinka

*Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy  
w Puławach*

OSIĄGNIĘCIA I WYZWANIA W HODOWLI TYTONIU ODPORNEGO  
NA WIRUSA BRĄZOWEJ PLAMISTOŚCI POMIDORA (TSWV)\*

**Słowa kluczowe:** *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana glauca*, hodowla odpornościowa, krzyżowanie międzygatunkowe, introgresja

Wstęp

Wirus brązowej plamistości pomidora (TSWV, ang. *Tomato spotted wilt orthotospovirus*) jest uznawany za jednego z najważniejszych wirusów roślin pod względem naukowym i ekonomicznym (26). TSWV jest typowym reprezentantem rodzaju *Orthotospovirus* (wcześniej *Tospovirus*), który obejmuje patogeny roślin wyjątkowe pod względem budowy oraz pochodzenia. Przedstawiciele tego rodzaju różnią się od większości wirusów roślin obecnością otoczki lipoproteinowej oraz polimerazy RNA związanej z nukleokapsydem (17). Badania molekularne wykazały podobieństwo tych patogenów do wirusów z rodziny *Bunyviridae* infekujących głównie kręgowce i stawonogi. W połączeniu z danymi na temat interakcji TSWV z owadzimi wektorami, badania te doprowadziły do sformułowania hipotezy na temat ewolucyjnego pochodzenia przedstawicieli rodzaju *Orthotospovirus* od patogenów owadów (26).

Największą motywacją do podjęcia badań nad TSWV są straty, jakie wirus ten wywołuje w uprawach wielu gatunków roślin na całym świecie. Już w latach 90. XX wieku były one szacowane na ponad 1 miliard dolarów rocznie (10, 26). TSWV obniża zbiory pomidorów i papryki na wszystkich kontynentach, dodatkowo poraża też ziemniaki, tytoń, sałatę, rośliny ozdobne, orzeszki ziemne, soję i inne gatunki uprawne (23). Jednak patogen ten infekuje nie tylko rośliny uprawne. Lista żywicieli TSWV obejmuje ponad 1000 gatunków roślin należących do 85 rodzin (24). Tak szeroki zakres żywicieli ma znaczenie dla rozwoju epidemii, ponieważ rośliny

\*Opracowanie wykonano w ramach zadania 6.3 pt. „Upowszechnianie wiedzy o wynikach uzyskiwanych w ramach realizacji zadania (hodowla i nasiennictwo chmielu i tytoniu)” z dotacji budżetowej przeznaczonej na realizację zadań MRiRW w 2022 r.

rosnące w sąsiedztwie pól uprawnych, w których namnaża się wirus, mogą stać się jego rezerwuarem i źródłem zakażenia gatunków uprawnych.

TSWV jest wirusem bardzo nietrwałym, nie przenosi się za pośrednictwem nasion i nie przechowuje się w resztkach roślin pozostałych po zbiorach na polach uprawnych (3). Pomimo to rozprzestrzenia się efektywnie dzięki swoim wektorom. TSWV jest przenoszony przez wciornastki – owady należące do rzędu przyłżeńców (*Thysanoptera*). W warunkach klimatycznych Polski efektywnym wektorem wirusa na plantacjach tytoniu jest wciornastek tytoniowiec (*Thrips tabaci*). Wciornastek zachodni (*Frankliniella occidentalis*), który jest głównym wektorem TSWV w USA, pojawia się w Polsce tylko pod osłonami i nie jest w stanie przetrwać w warunkach polowych (17). W kontekście epidemii brązowej plamistości pomidora na tytoniu, najważniejszymi aspektami biologii *T. tabaci* są ich wysoka płodność (samica składa ok. 100 jaj, przy czym w ciągu jednego sezonu wegetacyjnego występuje 2–4 pokoleń) oraz wykorzystywanie jako pokarmu wielu gatunków roślin, które mogą być gospodarzami TSWV (3).

### TSWV na plantacjach tytoniu w Polsce

W Polsce na plantacjach tytoniu po raz pierwszy stwierdzono występowanie brązowej plamistości pomidora w 1950 r. w okolicach Zamościa (29). Potem zasięg występowania tej wirozy stopniowo się zwiększał, obejmując kolejne rejony uprawy tytoniu. Laskowska (18), powołując się na informacje uzyskane w roku 2007 od Związku Plantatorów Tytoniu i firm zajmujących się skupem surowca, odnotowała, że zniszczenia spowodowane przez tę chorobę w rejonach lubelsko-podkarpackim i świętokrzysko-małopolskim obejmowały 5–40% plantacji, natomiast w rejonie dolnośląskim – 10–45% plantacji. W rejonie kujawsko-pomorskim znajdowano tylko nieliczne porażone rośliny, natomiast rejon mazurski został uznany za wolny od TSWV.

W ubiegłym roku opublikowano wyniki monitoringu występowania pięciu wirusów (w tym TSWV) na plantacjach tytoniu w różnych rejonach uprawy w Polsce (15). Do badań pobierano próbki z roślin tytoniu wykazujących objawy chorób wirusowych oraz z chwastów występujących na tym samym polu lub w jego bezpośrednim sąsiedztwie, bez względu na objawy. Testy serologiczne przy użyciu metody DAS-ELISA wykazały, że w badanym materiale najczęściej wykrywano TSWV. Stwierdzono jego obecność w 56,1% próbek tytoniu i 17,5% próbek chwastów. TSWV wykryto we wszystkich próbkach tytoniu pobranych w województwach dolnośląskim i świętokrzyskim oraz w 65,7% i 4,2% próbek odpowiednio z woj. lubelskiego i kujawsko-pomorskiego. Nie badano próbek tytoniu z woj. podlaskiego, gdyż nie znaleziono w tym rejonie roślin tytoniu z objawami chorób wirusowych. Wyniki te potwierdzają, że choroba nadal stosunkowo często występuje na południu kraju. Niski procent porażonych roślin tytoniu w woj. kujawsko-pomorskim w tym monitoringu (15) nie odzwierciedla wyników corocznych lustracji plantacji w tym rejonie, które wskazują na dość częste

porażenia tytoniu przez TSWV (M. Przybyś – dane nieopublikowane). Do tej pory nie ma natomiast informacji o występowaniu brązowej plamistości pomidora na tytoniu w woj. podlaskim, pomimo tego, że w tym rejonie stwierdzono obecność TSWV w chwastach (wykryto go w 9,1% próbek chwastów) (15). *T. tabaci* jest poważnym szkodnikiem tytoniu np. w okolicach Augustowa (T. Doroszevska i A. Berbec – informacja ustna), dlatego faktu nieodnotowania objawów choroby na tytoniu w woj. podlaskim nie można też tłumaczyć nieobecnością wektora. Wyjaśnienie tego zjawiska wymaga dalszych badań na temat efektywności przenoszenia TSWV w tym rejonie.

Chwasty mogą stanowić rezerwuar patogenów wirusowych i źródło zakażeń roślin uprawnych. Wśród gatunków roślin zawartych na liście żywicieli TSWV znajduje się wiele gatunków chwastów, które powszechnie występują na polach tytoniu w naszym kraju (14, 24). W tabeli 1 zestawione są gatunki roślin, w których stosunkowo często wykrywano TSWV w ramach wyżej opisanego monitoringu w różnych rejonach uprawy tytoniu w Polsce.

Tabela 1

Lista gatunków roślin (innych niż tytoń), w których najczęściej wykrywano TSWV w ramach monitoringu występowania wirusów na plantacjach tytoniu lub w ich bezpośrednim sąsiedztwie, w pięciu województwach (lubelskim, świętokrzyskim, dolnośląskim, kujawsko-pomorskim i podlaskim)

Gatunek	Nazwa łacińska	Liczba badanych próbek	Procent próbek, w których wykryto TSWV
Niezapominajka polna	<i>Myosotis arvensis</i> (L.) Hill.	10	100,0
Żótlca drobnokwiatowa	<i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	19	52,6
Żótlca owłosiona	<i>Galinsoga ciliata</i> (Raf.) S.F. Blake	16	43,8
Tasznik pospolity	<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medik	13	23,1
Maruna nadmorska bezwonna	<i>Matricaria maritima</i> L. subsp. <i>inodora</i> (L.)	18	22,2
Krwawnik pospolity	<i>Achillea millefolium</i> L.	10	20,0
Komosa biała	<i>Chenopodium album</i> L.	45	17,8
Ziemniak	<i>Solanum tuberosum</i> L.	6	16,7
Skrzyp polny	<i>Equisetum arvense</i> L.	14	14,3
Przetacznik perski	<i>Veronica persica</i> Poir.	7	14,3
Fiołek polny	<i>Viola arvensis</i> Murray	20	10,0
Ostrożeń polny	<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop.	11	9,1
Powój polny	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	14	7,1
Rdest kolankowy	<i>Polygonum lapathifolium</i> L. subsp. <i>lapathifolium</i>	19	5,3
Chwastnica jednostronna	<i>Echinochloa crus-gali</i> (L.) P. Beauv.	24	4,2

\*opracowanie własne na podstawie Korbecka-Glinka i in. (15)

## Objawy porażenia tytoniu przez TSWV i metody ochrony

Objawy porażenia roślin tytoniu przez TSWV obejmują: jasne lub nekrotyczne plamy, karłowaty wzrost roślin, charakterystyczne zagięcie wierzchołka pędu, żółknięcie, brunatnienie i nekroza dużych fragmentów liści oraz obumieranie roślin (3). Rośliny tytoniu mogą zostać zainfekowane przez TSWV przez cały okres wegetacyjny. Jednak porażenie młodych roślin jest najbardziej niebezpieczne, ponieważ skutkuje zahamowaniem wzrostu i obumieraniem roślin. Masowe porażenie roślin na wczesnym etapie rozwoju często prowadzi do całkowitego zniszczenia plantacji.

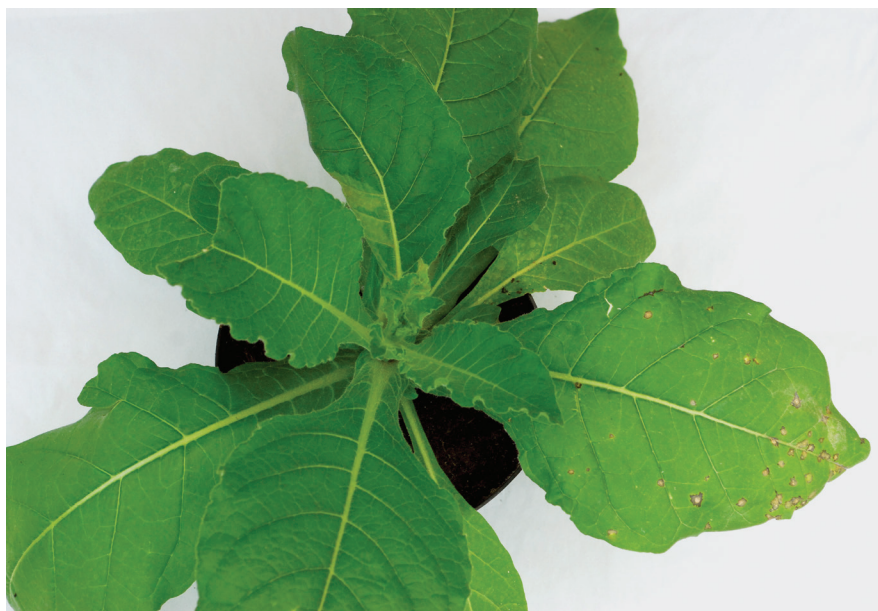
Rutynowym zabiegiem ograniczającym rozprzestrzenianie się wirusa jest opryskiwanie pól i terenu w ich sąsiedztwie insektycydami niszczącymi wciornastki. Wykonanie tego zabiegu jest szczególnie istotne jesienią (po zbiorach) oraz wiosną (na 5–6 dni przed wysadzeniem roślin na pole), ponieważ w tych terminach eliminowane są dorosłe, zainfekowane wciornastki zimujące w glebie, które wiosną powodują zakażenie młodych roślin tytoniu (3).

Używanie tego samego insektycydu na tym samym polu przez dłuższy okres czasu może doprowadzić do uodpornienia się owadów na substancję czynną. Dlatego rekomendowana jest rotacja użycia różnych substancji czynnych lub zastosowanie alternatywnych metod ochrony. Aktualnie do zwalczania wciornastka tytoniowca w tytoniu dopuszczone jest stosowanie środków zawierających acetamipryd, lambda-cyhalotrynę lub olejek pomarańczowy (25). Z niechemicznych metod zalecana jest rotacja upraw, szczególnie w przypadku silnego porażenia plantacji we wcześniejszym sezonie. Ponadto istotne jest też usuwanie chwastów z terenu plantacji i jej sąsiedztwa wczesną wiosną, ponieważ niektóre z tych roślin mogą być rezerwuarem wirusa. Najlepszą metodą ochrony przed chorobami wirusowymi jest uprawa odmian odpornych. Niestety wszystkie odmiany tytoniu uprawiane obecnie w Polsce wykazują podatność na TSWV.

## Źródła odporności na TSWV dostępne dla hodowli tytoniu

Hodowla ukierunkowana na odporność tytoniu na TSWV ma do dyspozycji tylko kilka źródeł odporności. Laskowska i in. (20) zbadali reakcję na inokulację TSWV u roślin pochodzących z 94 obiektów z rodzaju *Nicotiana*, z kolekcji Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowego Instytutu Badawczego. Spośród dzikich gatunków z rodzaju *Nicotiana* tylko przedstawiciele sekcji *Alatae* (*N. alata*, *N. forgetiana* oraz *Nicotiana* × *sanderiae*, który jest gatunkiem syntetycznym otrzymanym z krzyżowania *N. alata* i *N. forgetiana*) wykazywali reakcję typu nadwrażliwości. Jest to reakcja obronna rośliny polegająca na szybkim obumieraniu komórek w miejscu penetracji tkanek przez patogen (1). Ma ona na celu ograniczenie rozprzestrzeniania się wirusa do sąsiednich komórek i tkanek. Typowym objawem takiej reakcji są drobne nekrotyczne plamki na liściach. Laskowska i in. (20) wyróżnili w swoim teście inokulacji dwa rodzaje reakcji nadwrażliwości w zależności od tego, czy ne-

krotyczne plamki pojawiały się tylko na dolnych, inokulowanych liściach (wtedy reakcję określano po prostu jako reakcja nadwrażliwości – HR, ang. *hypersensitive reaction*) (fot.1), czy były one odnotowane także na liściach młodszych, ze środkowego i górnego piętra rośliny (w tym przypadku reakcję określano jako systemiczna reakcja nadwrażliwości – SHR, ang. *systemic hypersensitive reaction*). Wystąpienie objawów na liściach, które nie były inokulowane świadczy o mniejszej skuteczności SHR, ponieważ migracja wirusa w obrębie rośliny nie została zahamowana. Spośród przedstawicieli sekcji *Alatae* wszystkie testowane rośliny *N. forgetiana* wykazywały objawy SHR. Natomiast rośliny reprezentujące dwa z siedmiu badanych obiektów *N. alata* oraz dwa z czterech badanych obiektów *Nicotiana* × *sanderiae* wykazywały objawy HR oraz ujemny wynik DAS-ELISA na obecność TSWV w górnych liściach. U pozostałych obiektów tych dwóch gatunków odnotowano SHR u 6,3–50,0% badanych roślin oraz HR u pozostałych. Wyżej opisane wyniki Laskowskiej i in. (20) pokazują, że najlepszymi źródłami odporności na TSWV spośród naturalnie powstałych gatunków z rodzaju *Nicotiana*, zawartych w kolekcji IUNG-PIB, są wybrane dwa obiekty *N. alata*, z których wszystkie testowane rośliny wykazują silną reakcję nadwrażliwości (HR) na inokulację TSWV. Fakt, że obiekty tego gatunku różnią się pod względem odporności może być konsekwencją m.in. dryfu genetycznego, ponieważ rozmnożenia kolekcyjne tej obcopolnej rośliny są zazwyczaj małymi populacjami.



Fot. 1. Objawy zarejestrowane po inokulacji TSWV na roślinie *Nicotiana alata*. Na dolnym, inokulowanym wcześniej liściu (z prawej strony) widoczne są objawy nadwrażliwości w postaci małych nekrotycznych plamek

Źródło: A. Depta, zasoby własne

## Przeniesienie odporności na TSWV z *N. alata* do tytoniu i pierwsze odmiany odporne

Gatunek *N. alata* Link et Otto należy do sekcji *Alatae*. Jest on obligatoryjnie obcopolny, posiada zaledwie 9 par chromosomów i z pochodzenia jest aneuploidem, ponieważ większość gatunków z rodzaju *Nicotiana* posiada 12 par chromosomów lub wielokrotność tej liczby (11). Natomiast *N. tabacum* jest gatunkiem samopylnym, naturalnym amphidiploidem powstałym w wyniku odrębnej linii ewolucyjnej i posiada 24 pary chromosomów (12, 13). Przeniesienie odporności na TSWV od *N. alata* do gatunku uprawnego poprzez krzyżowanie międzygatunkowe jest dość trudne ze względu na małą liczbę uzyskiwanych nasion mieszańców i niską przeżywalność siewek, które z nich wyrastają (2). Różnice w liczbie chromosomów i niezbyt wysoki poziom homologii chromosomowej u tych dwóch gatunków utrudniają przebieg mejozy u mieszańców. Z badań cytogenetycznych mieszańców  $F_1$  (*N. tabacum* × *N. alata*) realizowanych w pierwszej połowie XX wieku, wynika, że liczba sparowanych chromosomów obserwowana w pierwszej metafazie mejozy wynosi od 5 do 9 (11), co oznacza, że nie zawsze każdy chromosom *N. alata* odnajduje swojego homeologa. Dobór odmiany tytoniu do krzyżowania z *N. alata* ma znaczenie dla liczebności i żywotności uzyskiwanych mieszańców. Berbec (2) wybrał do krzyżowania z *N. alata* odmianę Nadwiślański Mały, ponieważ wcześniejsze badania pokazały, że z takiego krzyżowania możliwe jest uzyskanie stosunkowo dużej liczby mieszańców. Jednak uzyskane przez tego autora rośliny  $F_1$  charakteryzowały się niską przeżywalnością i były całkowicie nieplonne. W mejozie nielicznych roślin odnotowano 0–10 biwalentów, przy czym ich liczba modalna wynosiła 6.

Wiele prób przeniesienia odporności na TSWV z *N. alata* do tytoniu zakończyło się niepowodzeniem. Dopiero zastosowanie w latach 80. XX wieku przez Zygmunta Gajosa (8), z ówczesnego Centralnego Laboratorium Przemysłu Tytoniowego w Krakowie, metody pomostowej polegającej na wykorzystaniu trzeciego gatunku (*N. otophora*) do krzyżowania międzygatunkowego doprowadziło do uzyskania odpornej odmiany tytoniu Polalta. Z kilku wcześniejszych publikacji tego autora można odtworzyć rodowód tej odmiany, chociaż nie zawierają one informacji o genotypach/odmianach *N. tabacum* użytych do krzyżowania ani dokładnych wyników badań cytologicznych otrzymanych mieszańców. W szczególności proces hodowlany przebiegał następująco: siewki mieszańca  $F_1$  (*N. tabacum* × *N. alata*) poddano kolchicynowaniu i otrzymano rośliny amfidiploidalne, z których jedna wytworzyła kwiaty męskopłodne. Roślina ta nie zawiązywała nasion w wyniku samozapylenia, ale jej pyłkiem zapyłono rośliny tytoniu szlachetnego. Z tego krzyżowania wstecznego uzyskano seskwidiploidalne rośliny  $BC_1$ , które w testach inokulacji TSWV wykazywały reakcję nadwrażliwości (4). Jednak te rośliny  $BC_1$  nie mogły być zapyłone pyłkiem własnym ani pyłkiem *N. tabacum*. Nasiona uzyskano dopiero po zapyleniu pyłkiem mieszańca otrzymanego z *N. tabacum* i *N. otophora*, przy czym mieszaniec ten był najprawdopodobniej amfidiploidem (5, 6). Testy inokulacji TSWV uzyskanych ro-

ślin i kolejne krzyżowania wsteczne ( $BC_3$ - $BC_5$ ) odpornych mieszańców do gatunku uprawnego pozwoliły na otrzymanie odpornych roślin, które mogły być rozmnażane przez samozapylenie. Stosunek liczby osobników odpornych i podatnych w testach inokulacji był zbliżony do 1:1 – u roślin uzyskanych z krzyżowań wstecznych oraz do 3:1 – u roślin z samozapylenia. Na tej podstawie wysnuto wniosek, że odporność na TSWV w tych materiałach hodowlanych jest warunkowana przez jeden dominujący gen (6). Selekcja homozygotycznych osobników odpornych na TSWV i otrzymanie dalszych pokoleń poprzez samozapylenie doprowadziło do uzyskania kilku linii hodowlanych (7). Z jednej z nich wyprowadzono później odmianę Polalta, która jest tytoniem ciemnym, w typie zbliżonym do Puławskiego (8).

Zygmunt Gajos (9) wykorzystał też swoje międzygatunkowe mieszańce z odpornością od *N. alata* do dalszych wielokrotnych krzyżowań wstecznych z odmianami Virginii, takimi jak: Virginia Skroniowska 78, Virginia SCR i Wiślica w celu otrzymania odmiany odpornej na TSWV w typie papierosowym jasnym. Prace te doprowadziły do otrzymania odmiany Virginia ZG-4 nazwanej potem Wiktoria. Obecnie odmiany Polalta i Wiktoria nie są uprawiane ze względu na niekorzystne cechy jakościowe.

Moon i Nicholson (21) opracowali markery molekularne sprzężone z odpornością na TSWV u odmiany Polalta. W tym celu najpierw otrzymali pokolenia  $F_1$  i  $F_2$  pochodzące z krzyżowania tej odmiany z odmianą podatną – K326. Test inokulacji wykonany na segregującej populacji  $F_2$  potwierdził, że odporność jest warunkowana przez jeden dominujący gen, ponieważ stosunek osobników odpornych do podatnych wynosił dokładnie 3:1. Natomiast linie podwojonych haploidów otrzymane z mieszańców  $F_1$  zostały poddane analizie polimorfizmu przy użyciu metody AFLP (z ang. *amplified fragment length polymorphism*). Zidentyfikowano 48 markerów polimorficznych różnicujących odporne i podatne linie podwojonych haploidów. Następnie wykorzystano 32 markery dające powtarzalne wyniki do konstrukcji mapy genetycznej, na której wykryto sprzężenie 25 z tych markerów z odpornością na TSWV. Wyniki amplifikacji 24 z nich różnicowały odmiany podatne i odporne, przy czym były one takie same dla odmian Polalta, Wiktora i *N. alata*. Cztery fragmenty AFLP ściśle sprzężone z odpornością na TSWV przekształcono w markery SCAR (z ang. *sequence characterized amplified region*), których zastosowanie w rutynowym genotypowaniu materiałów hodowlanych jest znacznie łatwiejsze w porównaniu z AFLP, ponieważ wymagane jest wykonanie tylko jednej reakcji PCR i sprawdzenie jej wyniku na żelu agarozowym.

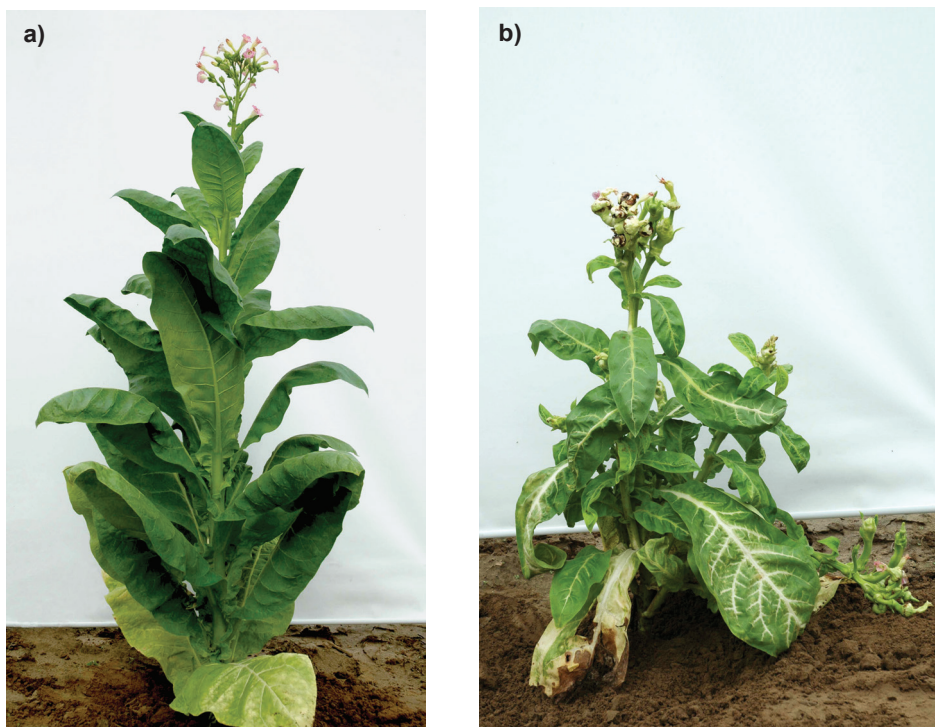
Laskowska i in. (20) wykorzystali dwa z ww. markerów SCAR do amplifikacji obiektów kolekcyjnych, które były również włączone do testu inokulacji TSWV. Wśród testowanych obiektów znajdowały się też odmiany Polalta i Wiktoria. Wszystkie rośliny odmiany Polalta wykazywały reakcję nadwrażliwości po inokulacji i amplifikowały markery SCAR związane z odpornością. Natomiast spośród 19 badanych roślin odmiany Wiktoria tylko cztery wykazały reakcję nadwrażliwości i amplifikowały te markery tak jak odmiana Polalta. Pozostałe testowane rośliny odmiany Wiktoria były podatne i nie amplifikowały tych markerów. Wynik ten sugeruje, że badana



populacja roślin tej odmiany była prawdopodobnie heterogeniczna, tj. składała się z homozygot dominujących i heterozygot względem genu odporności oraz podatnych homozygot recesywnych. Jednak w późniejszej publikacji Trojak-Goluch i in. (28), nawiązując do wyżej opisanych badań, biorą pod uwagę możliwość, że odporność odmiany Wiktorja jest niestabilna, co sugeruje raczej problem z ekspresją genu odporności. Alternatywnym wyjaśnieniem może być losowa eliminacja introgresji warunkującej odporność, np. w procesie gametogenezy. Potwierdzenie wyżej wymienionych przypuszczeń wymaga dodatkowych badań na temat dziedziczenia lub ekspresji czynników warunkujących odporność odmiany Wiktorja.

### Wykorzystanie odmiany Polalta w hodowli odmian odpornych na TSWV w IUNG-PIB

Wykorzystanie odmiany Polalta w dalszej hodowli jako źródła odporności jest dość ograniczone, ponieważ mieszańce  $F_1$  uzyskane z krzyżowania z innymi odmianami tytoniu wykazują szereg deformacji morfologicznych, które nie występowały u form rodzicielskich. Na przykład u mieszańców  $F_1$  odmian Polalta i Wiślica stwierdzono karłowatość, guzy na kwiatostanach, liście o anormalnym, wydłużonym lub taśmowatym kształcie i grubych nerwach (19) (fot. 2 a,b).



Fot. 2. Pokrój rośliny z odmiany Polalta (a) oraz mieszańca  $F_1$  (Polalta  $\times$  Wiślica) (b)

Źródło: D. Laskowska, zasoby własne

Pojawianie się podobnych deformacji u mieszańców pochodzących od odmiany Polalta odnotowano też w zagranicznych ośrodkach naukowych (21, 22). Geny warunkujące powstawanie deformacji morfologicznych wydają się być sprzężone z genem odporności na TSWV. Dlatego trudno wyselekcjonować z segregujących populacji rośliny odporne bez deformacji morfologicznych. Na przykład Moon i Nicholson (21) wykonali krzyżowania wsteczne roślin  $F_2$  ( $K326 \times$  Polalta) do odmiany K326 w celu redukcji rozmiarów introgresji, jednak wśród 1080 roślin z pokolenia  $BC_3$  nie uzyskali osobników odpornych o normalnym fenotypie.

W celu przełamania tego niekorzystnego sprzężenia Laskowska i Berbeć (19) zastosowali metody hodowlane oparte na kulturach *in vitro* (takie jak androgeniza i regeneracja podwojonych haploidów z fragmentów walca osiowego), które są znane ze swojego mutagennego działania. Z pylników mieszańca  $F_1$  (Polta  $\times$  Wiślica) uzyskano w warunkach *in vitro* 400 roślin haploidalnych. Większość z nich wykazywała poważne deformacje nie tylko w kulturach *in vitro*, ale i w późniejszym okresie wzrostu. Po teście inokulacji TSWV wykonanym w warunkach szklarniowych wyselekcjonowano tylko 5 odpornych roślin bez deformacji. Następnie otrzymano z nich linie podwojonych haploidów poprzez regenerację pędów z fragmentów walca osiowego w kulturach *in vitro* i samozapylenie płodnych regenerantów. Do dalszych badań wyselekcjonowano 3 linie (PW-833, PW-834, PW-900), z których wszystkie rośliny wykazywały reakcję nadwrażliwości na TSWV i cechowały się najlepszą morfologią. Otrzymano też mieszańce  $F_1$  ww. linii PW z Wiślicą. Udział roślin odpornych i podatnych w potomstwie uzyskanym przez krzyżowanie wsteczne tych mieszańców do Wiślicy oraz w pokoleniu  $F_2$  potwierdził hipotezę o determinacji cechy odporności przez jeden dominujący gen. Po względem cech morfologicznych otrzymane linie PW przypominały tytoń ciemny, tj. były zbliżone do odmiany Polalta (D. Laskowska – informacja ustna).

W kolejnych latach Trojak-Goluch i in. (27) włączyli wybrane linie PW do analogicznie prowadzonego procesu hodowlanego, którego celem było wprowadzenie cech tytoniu typu papierosowego jasnego oraz odporności na czarną zgniliznę korzeni, która jest groźną chorobą grzybową powodowaną przez *Thielaviopsis basicola* (gatunek ostatnio sklasyfikowany jako *Berkeleyomyces* spp.). Linie hodowlaną PW-834 krzyżowano z linią WGL 3, która jest odporna na *Th. basicola* oraz izogeniczna do odmiany Wiślica. Pylniki roślin  $F_1$  ( $WGL\ 3 \times$  PW-834) poddano androgenizie i otrzymano 242 rośliny haploidalne, które sklonowano i włączono do testów inokulacji przy użyciu badanych patogenów. Tylko 24 haploidy wykazywały odporność na *Th. basicola* oraz TSWV. Z roślin tych uzyskano 15 linii podwojonych haploidów (nazywanych dalej liniami DH), potwierdzono odporność tych linii na obydwa patogeny w szklarniowych testach inokulacji oraz oceniono ich morfologię w doświadczeniu polowym (28). Wyniki pokazują skuteczność eliminacji deformacji morfologicznych w tym programie hodowlanym, ponieważ średni stopień deformacji nowych linii DH (ocenionych za pomocą 6-stopniowej skali) wahał się pomiędzy 0,01 i 1,5, podczas gdy dla linii PW-834 wynosił on 2,1, a dla odmiany Polalta – 4,3.

Zaobserwowano dużą zmienność między badanymi liniami w wysokości roślin oraz strukturze, kolorze i rozmiarach liści. Większość badanych linii DH charakteryzowała się statystycznie istotnie mniejszą wysokością roślin oraz liczbą i szerokością liści w porównaniu z linią WGL 3. Jednak do dalszych badań wybrano dwie linie DH o fenotypie najbardziej zbliżonym do tej linii rodzicielskiej.

Do dalszych prac hodowlanych opracowano nowe markery molekularne, które pozwoliły nie tylko na selekcję osobników homozygotycznych z dwoma kopiami introgresji z populacji segregujących, ale i na wykrycie rekombinantów w rejonie introgresji (16). Wykonano sekwencjonowanie całych genomów *N. tabacum*, *N. alata* i odmiany Polalta oraz analizę podobieństwa odczytów dla uzyskanych danych. W genomie Polalta zlokalizowano introgresję od *N. alata*, która jest związana z odpornością na TSWV. Znajduje się ona w rejonie grupy sprzężeń nr 7 i odpowiada odcinkowi 0–40 cM u *N. tabacum*. Otrzymane sekwencje *N. tabacum* i *N. alata* z tego rejonu chromosomowego pozwoliły na zaprojektowanie gatunkowo specyficznych starterów PCR. Tak uzyskane markery zastosowano do genotypowania segregującej populacji F<sub>2</sub> otrzymanej z krzyżowania wybranych linii DH z WAC 121D7 (wysokoplenną odmianą tytoniu papierosowego jasnego). Wśród 1550 roślin F<sub>2</sub> zidentyfikowano 15,5% homozygot z dwoma kopiami introgresji od *N. alata*, 51,2% heterozygot oraz 33,1% homozygot bez introgresji. W analizie morfologicznej stwierdzono deformacje morfologiczne niektórych roślin dotyczące głównie unerwienia liści (grube i nieregularne nerwy liści). Znacznie rzadziej rejestrowano nienormalny kształt liści (wąskie lub taśmowate liście). W przybliżeniu połowa homozygot z introgresją i heterozygot wykazywała ww. deformacje. Natomiast wśród homozygot bez introgresji problemy z morfologią były rzadsze, bo dotyczyły tylko 26% roślin. Wynik ten wskazuje na to, że badana introgresja jest częściowo odpowiedzialna za powstawanie deformacji morfologicznych u form mieszańcowych otrzymanych w tym programie hodowlanym. Zmniejszenie rozmiarów tej introgresji w celu eliminacji niekorzystnych sprzężeń genu odporności na TSWV z genami wpływającymi na fenotyp, w przypadku metod konwencjonalnych, wymaga otrzymania rekombinantów. Niestety frekwencja rekombinacji w tych materiałach hodowlanych jest dość niska (w wyżej opisanej populacji F<sub>2</sub> frekwencja ta wynosiła 0,2%), co jest prawdopodobnie efektem niskiej homologii rejonów chromosomowych pochodzących od *N. alata* i *N. tabacum*. Problem ten stanowi największe wyzwanie dla hodowli tytoniu ukierunkowanej na odporność na TSWV. Rozwój metod molekularnych pozwalających na genotypowanie wielu tysięcy roślin i coraz tańsze sekwencjonowanie genomów daje nadzieję na otrzymanie pożądaných rekombinantów w przyszłości.

### Podsumowanie

Hodowla tytoniu ukierunkowana na odporność na TSWV wykorzystuje jako źródło odporności głównie gatunek *N. alata* oraz odmianę Polalta, do której przeniesiono odporność od tego gatunku. Odmiana Polalta nie jest uprawiana ze względu na nieko-

rzystne cechy jakościowe, a jej wykorzystanie w hodowli jest utrudnione, ponieważ krzyżowanie z innymi odmianami tytoniu prowadzi do deformacji morfologicznych mieszańców  $F_1$ . Dotychczasowa hodowla realizowana w IUNG-PIB doprowadziła do zmniejszenia zaawansowania deformacji morfologicznych otrzymanych linii hodowlanych. Jednak całkowite wyeliminowanie tych problemów fenotypowych przy użyciu konwencjonalnych metod jest utrudnione ze względu na niekorzystne sprzężenie genów, które je warunkują z genami odporności na TSWV w obrębie introgresji od *N. alata* oraz niską częstość rekombinacji w tym rejonie chromosomowym. Rozwój metod molekularnych pozwalających na masowe genotypowanie i sekwencjonowanie roślin może pomóc w uzyskaniu pożądanych rekombinantów w przyszłości.

### Literatura

1. Balint-Kurti P.: The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology*, 2019, **20(8)**: 1163-1178.
2. Berbeć A.: Cytogenetical study on *Nicotiana tabacum* L. cv. Nadwiślański Mały (2x and 4x) × *Nicotiana alata* Link et Otto. *Genetica Polonica*, 1987, **28(3)**: 251-261.
3. Doroszevska T., Berbeć A., Czarnecka D., Kawka M.: Choroby i szkodniki tytoniu. IUNG-PIB, Puławy 2013, pp. 222.
4. Gajos Z.: Z badań nad odpornością międzygatunkowych mieszańców *Nicotiana tabacum* L. × *Nicotiana alata* Link. na wirus brązowej plamistości pomidora (*Lycopersicum virus 3* Smith). *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 1976, **182**: 83-89.
5. Gajos Z.: Próby wykorzystania mieszańców *Nicotiana tabacum* L. × *Nicotiana otophora* Griz w hodowli tytoniu odpornego na *Perenospora tabacina* Adam (PT-2) i inne choroby. *Biuletyn Centralnego Laboratorium Przemysłu Tytoniowego*, 1979, **1-2**: 11-24.
6. Gajos Z.: Inheritance of resistance to tomato spotted wilt virus in interspecies hybrids *Nicotiana tabacum* L. × *Nicotiana alata* Link. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 1981, **244**: 117-126.
7. Gajos Z.: Przeniesienie odporności na wirus brązowej plamistości pomidora (Tomato spotted wilt virus) z *Nicotiana alata* Link. et Otto. do tytoniu szlachetnego przez skrzyżowanie obu gatunków. *Biuletyn Centralnego Laboratorium Przemysłu Tytoniowego*, 1981, **1-2**: 3-24.
8. Gajos Z.: Polalta – odmiana tytoniu odporna na wirus brązowej plamistości pomidora (TSWV) i czarną zgniliznę korzeni (*Thielaviopsis basicola* Ferr.). *Biuletyn Centralnego Laboratorium Przemysłu Tytoniowego*, 1988, **1-4**: 7-25.
9. Gajos Z.: Virginia ZG-4 (Wiktoria) – nowa odmiana tytoniu odporna na wirus brązowej plamistości pomidora (TSWV) i czarną zgniliznę korzeni (*Thielaviopsis basicola*). *Biuletyn Centralnego Laboratorium Przemysłu Tytoniowego*, 1993, **1-4**: 5-19.
10. Goldbach R., Peters D.: Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. *Seminars in Virology*, 1994, **5(2)**: 113-120.
11. Goodspeed T.H.: The genus *Nicotiana*. Origins, relationships and evolution of its species in the light of their distribution, morphology and cytogenetics. Waltham, Massachusetts., U.S.A.: Chronica Botanica Company. 1954, xxii+536. Illus. Maps. pp.
12. Kenton A., Parokonny A.S., Gleba Y.Y., Bennett M.D.: Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *Molecular & General Genetics*, 1993, **240(2)**: 159-169.
13. Knapp S.: Biodiversity of *Nicotiana* (Solanaceae). In: *The tobacco plant genome*, N.V. Ivanov, N. Sierro, M.C. Peitsch (eds). Cham, Switzerland: Springer, 2020, pp. 21-41.
14. Korbecka-Glinka G.: Chwasty na polach tytoniu – groźniejsze niż wyglądają. *Przegląd Tytoniowy*, 2019, **1**: 7-9.

15. Korbecka-Glinka G., Przybyś M., Feledyn-Szewczyk B.: A survey of five plant viruses in weeds and tobacco in Poland. *Agronomy*, 2021, **11(8)**: 1667.
16. Korbecka-Glinka G., Trojak-Goluch A., Doroszewska T., Goepfert S.: Wpływ introgresji pochodzącej od *Nicotiana glauca* na deformacje morfologiczne linii hodowlanych tytoniu odpornych na wirus brązowej plamistości pomidora (TSWV). *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, 2019, **285**: 123-124.
17. Kryczyński S., Balukiewicz A., Golnik K.: Tospowirusy – niezwykła grupa wirusów roślin. *Postępy Nauk Rolniczych*, 2005, **1**: 17-32.
18. Laskowska D.: Charakterystyka groźnej choroby tytoniu – brązowej plamistości pomidora i rola wektora w jej przenoszeniu. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 2008, **13**: 43-50.
19. Laskowska D., Berbec A.: TSWV resistance in DH lines of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from a hybrid between ‘Polalta’ and ‘Wiślica’. *Plant Breeding*, 2010, **129(6)**: 731-733.
20. Laskowska D., Doroszewska T., Depta A., Kurska K., Olszak-Przybyś H., Czubacka A.: A survey of *Nicotiana* germplasm for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). *Euphytica*, 2013, **193(2)**: 207-219.
21. Moon H., Nicholson J.S.: AFLP and SCAR markers linked to *Tomato spotted wilt virus* resistance in tobacco. *Crop Science*, 2007, **47(5)**: 1887-1894.
22. Nielsen M.T.: Inheritance of resistance to tomato spotted wilt virus. *Proc. CORESTA Meeting, Agronomy/Phytopathology*, Budapest, 1993.
23. Pappu H.R., Jones R.A.C., Jain R.K.: Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Research*, 2009, **141(2)**: 219-236.
24. Parrella G., Gognalons P., Gebre-Selassie K., Vovlas C., Marchoux G.: An update of the host range of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of Plant Pathology*, 2003, **85(4)**: 227-264.
25. Przybyś M.: Program ochrony tytoniu. Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy 2022, ss. 20.
26. Scholthof K.B.G., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G.D.: Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 2011, **12(9)**: 938-954.
27. Trojak-Goluch A., Laskowska D., Agacka M., Czarnecka D., Kawka M., Czubacka A.: Effectiveness of combining resistance to *Thielaviopsis basicola* and *Tomato spotted wilt virus* in haploid tobacco genotypes. *Breeding Science*, 2011, **61(4)**: 389-393.
28. Trojak-Goluch A., Laskowska D., Kurska K.: Morphological and chemical characteristics of doubled haploids of flue-cured tobacco combining resistance to *Thielaviopsis basicola* and TSWV. *Breeding Science*, 2016, **66(2)**: 293-299.
29. Zawirska I.: *Studia nad Thrips tabaci* Lindeman (*Thysanoptera, Thripidae*). *Prace Naukowe Instytutu Ochrony Roślin*, 1978, **20(1)**: 15-138.

---

Adres do korespondencji:

dr Grażyna Korbecka-Glinka  
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin  
IUNG-PIB  
ul. Czartoryskich 8  
24-100 Puławy  
tel. 81 4786 935  
e-mail: [Grazyna.Korbecka@iung.pulawy.pl](mailto:Grazyna.Korbecka@iung.pulawy.pl)

---

AUTOR

Grażyna Korbecka-Glinka

ORCID

0000-0002-6358-8230

**Anna Depta**

*Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy  
w Puławach*

ODPORNOŚĆ TYTONIU NA WIRUSA Y ZIEMNIAKA  
I PRACE HODOWLANE PROWADZONE W KIERUNKU UZYSKANIA  
FORM ODPORNYCH\*

**Słowa kluczowe:** *Nicotiana tabacum*, PVY, geny odporności, transformacja genetyczna

**Wstęp**

Tytoń szlachetny (*Nicotiana tabacum* L.) to ważny przemysłowy gatunek pochodzący pierwotnie z terenu Ameryki Południowej. Do Europy został przywieziony przez Krzysztofa Kolumba, a do Polski trafił w XVI wieku z Turcji. Rozwój uprawy tytoniu w Polsce nastąpił już w XVII wieku za sprawą umowy, w myśl której król Jan III Sobieski zobowiązał się dostarczyć tytoń królowi Francji Ludwikowi XIV (4), a następnie po powołaniu w 1922 r. Polskiego Monopolu Tytoniowego (6).

Tytoń uprawiany jest obecnie w blisko 100 krajach świata, m.in. w Polsce. Najwięcej tytoniu uprawia się w krajach Azji oraz Ameryki Południowej i Północnej, a znacząco mniej w Europie. Uprawa tytoniu w Polsce stanowi ważną gałąź produkcji roślinnej zapewniającą dochodowość gospodarstw w rejonach ze słabymi glebami (4). W ostatnich latach, po zaprzestaniu dopłat do produkcji tytoniu, część producentów zrezygnowała z uprawy. Mimo to dla znacznej grupy plantatorów uprawa tytoniu jest jedynym źródłem dochodu. W związku z tym istnieje potrzeba, by uzyskiwać odmiany tytoniu o coraz lepszych cechach jakościowych, jak i odpornościowych.

Jakość plonu zależy od wielu czynników, w tym od odporności na patogeny powodujące choroby. Sprawcami chorób tytoniu są bakterie, grzyby i wirusy. Duże zagrożenie stanowią również owady będące szkodnikami, jak również wektorami przenoszącymi choroby wirusowe. Sprawcami chorób bakteryjnych tytoniu są *Pseudomonas syringae* i *Pseudomonas angulata*. Głównym źródłem zakażenia roślin

\*Opracowanie wykonano w ramach zadania 6.3 pt. „Upowszechnianie wiedzy o wynikach uzyskiwanych w ramach realizacji zadania (hodowla i nasiennictwo chmielu i tytoniu)” z dotacji budżetowej przeznaczonej na realizację zadań MRiRW w 2022 r.

w polu tymi bakteriami jest chora rozsada, dlatego bardzo ważne są odpowiednie zabiegi profilaktyczne na etapie produkcji rozsady, poprzez stosowanie odkażonych nasion, wolnego od patogenów podłoża, jak też odkażanie narzędzi. Choroby grzybowe wywoływane są przez wiele patogenów (m.in.: *Thielaviopsis basicola*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria alternata* i inne). W celu uniknięcia zakażenia należy stosować odpowiednią profilaktykę i agrotechnikę, a w przypadku porażenia możliwe jest zastosowanie fungicydów. Choroby wirusowe stanowią duży problem w uprawie tytoniu, gdyż ochrona chemiczna często jest nieskuteczna i ogranicza się jedynie do zmniejszenia populacji wektora, ale nie zapobiega rozwojowi infekcji wywołanej wirusem.

### Charakterystyka PVY i reakcje roślin na infekcję

Szczególnie duże zagrożenie powodujące znaczne straty ekonomiczne w uprawie tytoniu w Polsce i na świecie stanowi wirus Y ziemniaka (PVY, ang. *Potato virus Y*) należący do rodzaju *Potyvirus* i wywołujący brunatną nekrozę nerwów (70). Uszkodzenie nerwów skutkuje zahamowaniem transportu wody i soli mineralnych do tkanek liści, a zmiany chorobowe blaszki liściowej w postaci plam chlorotycznych i nekrotycznych ograniczają powierzchnię i zdolność asymilacyjną oraz wymianę gazową roślin (rys. 1). Prowadzi to do zahamowania wzrostu roślin, a niekiedy do ich całkowitego zamierania (85). Ponadto PVY powoduje wzrost zawartości azotanów w liściach, co pogarsza jakość wysuszonego surowca (82). Wirus ten przenoszony jest przez mszyce w sposób nietrwały (15), co uniemożliwia skuteczną ochronę chemiczną.

Ważną cechą PVY jest jego zróżnicowanie i zdolność do rekombinacji (37, 65). Na podstawie objawów chorobowych na ziemniaku i tytoniu, jak również badań serologicznych i molekularnych, wyodrębniono trzy główne grupy tego wirusa. Szczep PVY<sup>o</sup> występuje powszechnie i powoduje głównie mozaikowe przebarwienia u większości odmian ziemniaka i podobne zmiany chorobowe w odmianach tytoniu (39). Szczep PVY<sup>c</sup> powoduje smugowatość u odmian ziemniaka posiadających gen *Nc* i nienekrotyczne objawy na tytoniu (31). Trzecią grupę stanowią izolaty PVY<sup>N</sup> powodujące nekrozy nerwów liści tytoniu. Ze względu na zróżnicowane objawy chorobowe na ziemniaku izolaty te podzielono na izolaty PVY<sup>NW</sup>, które powodują słabe objawy mozaiki na liściach ziemniaka oraz PVY<sup>NTN</sup>, które prowadzą do powstania nekrozy bulw (13, 49).

W uprawie tytoniu największe zagrożenie stanowią izolaty PVY<sup>N</sup>, które nie tylko powodują nekrozy nerwów, ale również mają zdolność do przełamania istniejących źródeł odporności (46). W celu ochrony roślin konieczne jest zatem prowadzenie prac hodowlanych w kierunku podniesienia odporności na wirusa Y ziemniaka. Jest to możliwe poprzez znajomość mechanizmów obronnych roślin, poszukiwanie źródeł odporności i przeniesienie genów odporności w wyniku krzyżowania międzyodmianowego i międzygatunkowego, a także z zastosowaniem inżynierii genetycznej.



Rys. 1. Objawy chorobowe w postaci nekroz nerwów i plam chlorotycznych na tytoniu spowodowane porażeniem przez PVY

Źródło: A. Depta

Zakażenie rośliny przez wirusa wymaga szeregu zgodnych interakcji pomiędzy czynnikami gospodarza i wirusa w ramach złożonego, wieloetapowego procesu, który obejmuje ekspresję i replikację genomu wirusowego oraz przemieszczanie się go zarówno między komórkami, jak i poprzez układ naczyniowy rośliny (22). Reakcja odpornościowa roślin na infekcję wirusową może być zróżnicowana. Całkowita odporność zwana immunią uniemożliwia replikację wirusa, zaś częściowa – ogranicza przemieszczanie się wirusa z komórki do komórki i w ten sposób chroni ją przed infekcją systemiczną. W wyniku infekcji wirusowej podatna roślina wykazuje silne objawy chorobowe, które mogą doprowadzić do jej zamierania. Natomiast słabe objawy lub ich brak przy jednoczesnej obecności wirusa w tkankach rośliny są objawem reakcji określanej jako tolerancja (14, 62).

Mechanizmy reakcji odpornościowej są warunkowane genetycznie i mogą za nią odpowiadać zarówno geny dominujące, jak i recesywne, przy czym odporność na wirusy z rodziny *Potyviriidae* częściej warunkowana jest genami recesywnymi niż w przypadku odporności na wirusy należące do innych rodzin (22). Genom PVY zbudowany jest z pojedynczej, sensownej nici RNA o długości 9700 nukleotydów. Na końcu 5' cząsteczki RNA znajduje się białko VPg (ang. *Veinal Protein genome linked*), zaś koniec 3' jest poliadenylowany (67, 80). Całość otoczona jest białkowym płasz-



czem (CP, ang. *coat protein*). Po wnikięciu do komórki gospodarza wirus w pierwszej kolejności wytwarza poliproteinę, która podlega w dalszym etapie proteolizie i w ten sposób powstają aktywne białka wirusowe (36). Badania wykazały, że wirusowe białko VPg wchodzi w interakcje z eukariotycznym czynnikiem inicjacji translacji eIF4E i jego formami izomerycznymi (87, 66). Czynniki inicjacji translacji są istotnymi składnikami komórki kodowanymi przez małą rodzinę wielogenową, która wiąże się ze strukturą czapeczki mRNA na końcu 5' większości mRNA. Białko VPg wirusa może oddziaływać z eIF4E, naśladując strukturę czapeczki 5' mRNA i w ten sposób infekować roślinę (7).

## Prace hodowlane wykorzystujące różne źródła odporności na PVY

### Odporność w obrębie gatunku *Nicotiana tabacum*

Gatunek *Nicotiana tabacum* L. obejmuje dużą liczbę odmian i linii hodowlanych o zróżnicowanej odporności na PVY, przy czym żadna odmiana nie wykazuje pełnej immunii na wszystkie szczepy tego wirusa. Podatność wielu uprawianych komercyjnie odmian tytoniu na nekrotyczne szczepy wirusa Y ziemniaka sprawiła, że konieczne były prace hodowlane nad poprawą tej odporności. Jedną z pierwszych metod było naświetlanie nasion podatnej odmiany Virgin A promieniami Rentgena, dzięki czemu uzyskano mutanty odporne na PVY (VAM, Virgin A Mutant) (42). Następnie w wyniku prowadzonej hodowli uzyskano wiele odmian o zwiększonej odporności na PVY. W tym celu zastosowano zarówno przeniesienie uzyskanej odporności na drodze klasycznej hybrydyzacji, jak i wykorzystywano metody selekcji masowej. Odmiana TN 86 posiada odporność pochodzącą od odmiany VAM (58), natomiast niemiecka odmiana Virginia SCR powstała w wyniku masowej selekcji z odmiany VN1 (12). Na bazie odmiany Virginia SCR powstała też odmiana Perevi (60). Należąca do tytoniu ciemnego odmiana PBD6 określana jest jako efekt selekcji form mieszańcowych uzyskanych z krzyżowania odpornej na PVY odmiany Paraguay P48 z Bel 61-10 (24). Polska odmiana Wiślica została uzyskana w wyniku klasycznej hodowli krzyżówkowej pomiędzy polską linią hodowlaną a odmianą amerykańską (45).

Odporność na wirusa Y ziemniaka obecna w odmianie VAM, jak również w innych wymienionych powyżej odmianach warunkowana jest przez pojedynczy recesywny gen *va* zlokalizowany na chromosomie 21 (25). Szczegółowe badania molekularne RAPD (ang. *Randomly Amplified Polymorphic DNA*) na liniach izogenicznych różniących się jedynie podatnością na PVY pozwoliły stwierdzić, że w odmianie VAM odporność ta spowodowana jest delecją o wielkości ok. 1 Mb w locus *Va* warunkującym podatność na PVY (59). Badania z użyciem japońskiego izolatu PVY-T wykazały, że istnieją trzy alleliczne formy genu *va*: *va*, *va1* i *va2* (89), których skuteczność w stosunku do PVY jest zróżnicowana. Acosta-Leal i Xiong (1) stwierdzili, że odporność w odmianie VAM składa się w rzeczywistości z dwóch genów recesywnych: *va1* i *va2*. Pierwszy z nich ogranicza przemieszczanie się wirusa z komórki do

komórki, a drugi ogranicza akumulację wirusa. Dlatego też odporność tej odmiany jest dość wysoka. Odmiany TN 86 i Wiślica posiadają słabszy allel *va1* (84), zaś odmiany V. SCR i PBD6 mają allel *va2*, który stanowi najmniejszą ochronę przed PVY (2, 46). Zostało to potwierdzone szeregiem badań odpornościowych przy użyciu izolatów PVY o zróżnicowanej zjadliwości (41, 57, 28, 45, 20).

Szczegółowe badania Julio i in. (41) z zastosowaniem sekwencjonowania nowej generacji pozwoliły dokonać analizy transkryptomów 12 wsobnych linii rekombinacyjnych (RILS) pokolenia  $F_7$ , które segregowały pod względem odporności na PVY. Poprzez porównanie z referencyjnymi transkryptomami zidentyfikowano geny różniące się ekspresją w roślinach podatnych i odpornych. Wśród wyselekcjonowanych około 30 kandydatów do sekwencjonowania znajdował się eukariotyczny czynnik inicjacji translacji (eIF4E), który wykazywał silną ekspresję tylko w podatnych odmianach. Gen *eIF4E* został zmapowany na chromosomie 21 i korespondował on do izoformy *eIF4E* pochodzącej od gatunku rodzicielskiego *N. sylvestris*. Badania te obejmowały również inokulację 163 obiektów *Nicotiana tabacum* izolatami PVY<sup>N</sup> oraz analizę tych roślin pod kątem obecności markerów molekularnych, w tym markera S10760, który związany był z eukariotycznym czynnikiem inicjacji translacji (eIF4E). Obiekty wykazujące objawy chorobowe amplifikowały wszystkie użyte markery, w tym S10760. Natomiast wśród obiektów uznanych za odporne na PVY zaobserwowano pewne zróżnicowanie. Dwadzieścia osiem nie amplifikowało żadnego markera, co może wskazywać na dużą delecję w obrębie badanego genu. Cztery odmiany nie amplifikowały markera S10760, ale amplifikowały pozostałe markery, co może świadczyć o mniejszej delecji. Natomiast 13 odmian uznanych za odporne amplifikowało wszystkie użyte markery. Zastosowanie sekwencjonowania pozwoliło stwierdzić, że posiadają one jedynie delecję obejmującą 2 pary zasad w pozycji 478-479 (41). Tak zróżnicowane wyniki w obrębie odmian odpornych były podstawą do dalszych badań nad trwałością odporności typu *va* (57). Spośród obiektów badanych wcześniej przez Julio i in. (41) wytypowano do dalszych badań cztery grupy, które różniły się wielkością delecji oraz zastosowano 9 izolatów PVY o zróżnicowanej zjadliwości. Grupa pierwsza (LD, ang. *Large Deletion*) obejmowała odmiany: VAM, Wiślica, TN86 i PBD6, posiadające dużą delecję na chromosomie 21. Grupa druga (SD, ang. *Small Deletion*) to odmiany takie jak: Elka245, Littre C, Philippin i Wika, które miały mniejszą delecję na chromosomie 21. Trzecia grupa (FS, ang. *Frameshift*) to odmiany: Burley DC, Semoy i Skro.L56, które posiadały delecję o wielkości dwóch par zasad w obrębie genu *eIF4E-1*, w wyniku czego nastąpiło skrócenie C-końcowego odcinka białka liczącego 163 aminokwasy. Czwartą grupę stanowiły mutanty (EMS-1 i EMS-2) otrzymane po zastosowaniu metanosulfonianu etylu, u których nastąpiło C-końcowe skrócenie białka zawierającego odpowiednio 50 lub 53 aminokwasy. Wyniki badań przeprowadzonych przez Michela i in. (57) wykazały zróżnicowaną reakcję na PVY w zależności od wielkości delecji. Najwyższą odpornością charakteryzowała się odmiana VAM, a nieco mniejszą TN86 i Wiślica. Najslabszą odporność

spośród odmian z grupy LD posiadała odmiana PBD6. Obiekty z pozostałych trzech grup odznaczały się znacznie mniejszą odpornością na PVY. Wyniki przedstawione powyżej są spójne z wynikami innych autorów (20, 28, 45, 83). Badania odporności pięciu odmian (VAM, Wiślica, TN86, V. SCR, PBD6) prowadzono w ramach działalności międzynarodowej organizacji CORESTA zarówno w warunkach polowych w 13 krajach świata (Węgry, Kolumbia, Szwajcaria, Polska, Niemcy, Francja, Macedonia, Włochy, Zimbabwe, Chiny, Iran, Chorwacja i Korea Płd.) (83), jak również w warunkach szklarniowych, gdzie zastosowano metodę inokulacji z wykorzystaniem 29 izolatów PVY należących do grup PVY<sup>NW</sup> i PVY<sup>NTN</sup> i pozyskanych z plantacji tytoniowych w Polsce (28). Uzyskane wyniki wskazują, że największą odpornością charakteryzowała się odmiana VAM, a następnie Wiślica i TN86, natomiast najgorzej wypadły odmiany PBD6 i V. SCR. Ocena odporności tego samego zestawu odmian za pomocą inokulacji w warunkach szklarniowych wraz z analizą molekularną odporności przy użyciu markera S10760 (51) została wykonana przez Korbecką-Glinkę i in. (45). W badaniach tych wykorzystano 10 izolatów PVY pochodzących z Polski i Niemiec, które zostały również szczegółowo scharakteryzowane pod względem molekularnym. Uzyskane wyniki są podobne do otrzymanych przez Doroszewską i Czubacką (28). Nieco szersze badania z użyciem 25 odmian, w tym 17 polskich, przeprowadziła Depta i in. (20). Na podstawie badań molekularnych z wykorzystaniem dwóch primerów opisanych przez Julio i in. (41) oraz Sierro i in. (72) zidentyfikowano 16 odmian z odpornością typu *va*. Inokulacja czterema izolatami PVY pozwoliła ocenić trwałość tej odporności dla badanych obiektów. Najwyższą odporność wykazała odmiana VAM, choć została ona porażona dwoma izolatami, reagując nekrozą nerwów. Odporność na jeden z czterech użytych izolatów obserwowano u sześciu odmian, w tym Wiślicy i V. SCR. Pozostałe odmiany posiadające recesywny gen *va* zareagowały nekrozami nerwów na wszystkie zastosowane izolaty (20).

Wyniki uzyskane przez Michela i in. (57) wskazują, że trwałość odporności na PVY zależy od typu mutacji w obrębie genu *elF4E-1*, pochodzącego od *N. sylvestris*, oraz w wyniku działania dodatkowych genów. Analiza genetyczna i transkryptomyczna wykazała obecność na chromosomie 14 genów pochodzących od *N. tomentosiformis*: *elF4E-2*, *elF4E-3* i *elF4E-4*. Dodatkowo na chromosomie 17, który uległ rearanzacji pomiędzy genomami gatunków rodzicielskich, występuje gen *elF4E-5* pochodzący od *N. sylvestris* oraz *elF4E-6* pochodzący od *N. tomentosiformis*.

Odporność na PVY warunkowana genami recesywnymi jest w zasadzie mechanizmem polegającym na utracie podatności spowodowanej brakiem możliwości interakcji białka VPg z czynnikiem inicjacji translacji *elF4E* (81). Delecja całego genu *elF4E-1*, jak w przypadku odmiany VAM, gwarantuje najwyższą odporność. Następuje wówczas nadekspresja genu *elF4E-2*, z którym wirus tworzy нефункционалне połączenia. Nadekspresja tego genu może być dodatkowo wzmocniona, gdy brakuje genu *elF4E-3*, a występuje hybryda *elF4E<sup>2-3</sup>*. Przedstawiona powyżej odporność typu *va* nie gwarantuje pełnej immunii na wszystkie szczepy PVY, gdyż wirus ten jest w stanie

przełamać tę odporność. Mechanizm przełamania odporności polega na zamianach aminokwasów w centralnej części białka VPg wirusa. Mutacje obejmują zamianę seryny na glicynę w pozycji 101, a także lizyny na treoninę lub kwas glutaminowy w pozycji 105 (48, 53, 65). Zmiany w obrębie białka VPg izolatów przełamujących odporność pozwalają połączyć się wirusowi z innym białkiem kodowanym przez geny z grupy *elF4E* (57).

Odporność warunkowana recesywnym genem *va* jest powszechnie wykorzystywana w hodowli odmian tytoniu i stanowi ochronę przed najczęściej występującymi izolatami PVY. Jednocześnie uprawa odmian odpornych sprawiła, że zwiększyła się liczba izolatów przełamujących odporność typu *va*, szczególnie z grupy PVY<sup>NTN</sup> (46, 47, 83).

Duże zagrożenie ze strony izolatów przełamujących odporność typu *va* powoduje, że konieczne jest poszukiwanie innych źródeł odporności. W badaniach Julio i in. (41) zidentyfikowano 10 obiektów, które nie wykazały nekroz nerwów na użyty izolat PVY, a jedynie mozaikowe przebarwienia i nie posiadały recesywnego genu *va*. Badania serologiczne wykazały obecność wirusa w tkance roślin. Szczegółowe badania nad tymi obiektami podjął Michel i in. (56) i wykazał, że istnieje mechanizm niezależny od genu *va* i jest on spowodowany mutacją w obrębie genu *NtTPNI* (ang. *Nicotiana tabacum Tolerance to PVY induced Necrosis I*) występującego na chromosomie 13 i związanego z domeną zawierającą powtórzenia bogate w leucynę (LRR, ang. *Leucine-rich repeat*). Mutacja ta polega na zamianie glicyny w argininę w pozycji 497. Domena LRR występuje u roślin w cytoplazmie w bliskim sąsiedztwie błony komórkowej i związana jest z reakcją odpornościową rośliny na atak patogenu. Odpowiedzialne za odporność geny R mogą działać protekcyjnie na konkretny patogen lub pełnić rolę tzw. strażnika, który wykrywa przyłączenie czynnika wirulencji do cząsteczki docelowej i uruchamia reakcję odpornościową (74). Zmiany w obrębie genu *NtTPNI* polegające na braku nekroz sugerują, że reakcja nekrotyczna na PVY<sup>N</sup> może być molekularnie i funkcjonalnie podobna do reakcji nadwrażliwości zależnej od genu R. W tym modelu objawy nekrozy nerwów byłyby konsekwencją specyficznej dla tkanki naczyniowej reakcji obronnej związanej z indukcją programowanej śmierci komórki (PCD). Indukowana przez PVY<sup>N</sup> nekroza nerwów może być uważana za rodzaj reakcji nadwrażliwości (HR), ale niezdolnej do ograniczenia infekcji wirusowej miejscowo, tak jak ma to miejsce w przypadku typowej reakcji nadwrażliwości (HR), ale prowadzi do porażenia systemicznego (56). Prezentowany powyżej mechanizm odporności nosi nazwę tolerancji, gdyż jedynie łagodzi objawy powodowane przez patogen, ale nie hamuje replikacji, przez co wirus jest obecny w roślinie i stanowi źródło infekcji. Pięć odmian tolerancyjnych (Zamojska 4, Virginia 278, Virginia Gold Dollar, LB Koro i Złotolistny IHAR) stwierdzono również w badaniach Depty i in. (20) w obrębie badanych 25 odmian tytoniu. Odmiany te po inokulacji czterema izolatami PVY, o zróżnicowanej zjadliwości, reagowały jedynie przejaśnieniami nerwów i plamami chlorotycznymi. Nie wystąpiły nekrozy nerwów, choć testy DAS-ELISA

potwierdziły obecność PVY w tkance roślinnej. Badania molekularne wykazały obecność genu podatności *Va*. Cecha tolerancji może być alternatywą w programach hodowlanych dla odporności typu *va*, która jest przełamywana przez zjadliwe izolaty PVY. Odmiany tolerancyjne, co prawda, wykazują słabe objawy chorobowe i zawierają wirusa w soku komórkowym, ale ich wzrost i rozwój jest prawidłowy, co zapewnia uzyskanie odpowiedniego plonu liści. W obrębie badanych przez Deptę i in. (20) odmian uzyskano również ciekawe wyniki dla odmiany Węgierski Ogrodowy, która pod względem molekularnym amplifikowała gen podatności *Va*, ale w zróżnicowany sposób zareagowała na zastosowane izolaty PVY. Izolat słaby IUNG 23 nie spowodował porażenia. Nie zaobserwowano objawów chorobowych, a testy DAS-ELISA nie wykazały obecności wirusa w soku komórkowym. Izolat określony jako średni, IUNG 17, wywołał słabe objawy w postaci przejaśnień nerwów i plam chlorotycznych, a obecność wirusa w badanych roślinach została potwierdzona serologicznie. Dwa izolaty uważane za silne spowodowały wystąpienie nekroz nerwów. Tak zróżnicowana reakcja odpornościowa odmiany Węgierski Ogrodowy na PVY wskazuje na możliwość posiadania innego rodzaju odporności niż pozostałe odmiany. Są to wskazania dla dalszych, bardziej szczegółowych badań celem ewentualnego wykorzystania tej odporności w programach hodowlanych.

### Odporność pochodząca od dzikich gatunków z rodzaju *Nicotiana*

Rodzaj *Nicotiana* należy do rodziny *Solanaceae* i obejmuje ponad 70 gatunków, w tym *Nicotiana tabacum*. Jest on bardzo zróżnicowany pod względem morfologii, cytogenetyki i składu chemicznego, a także pod kątem odporności na patogeny (29). Badania odporności gatunków *Nicotiana* prowadzono w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach już w latach 70. XX wieku. Ponadto Sievert (73) przebadiał 62 gatunki przy użyciu dwóch izolatów PVY, spośród których 11 gatunków uznał za immunne: *N. benavidesii*, *N. glauca*, *N. knightiana*, *N. miersii*, *N. noctiflora*, *N. otophora*, *N. raimondii*, *N. thyrsoiflora*, *N. tomentosa*, *N. tomentosiformis* i *N. wigandioides*. Badania Głazewskiej (38), przy użyciu dwóch szczepów: PVY<sup>N</sup> i PVY<sup>NZ</sup>, wykazały nieco inną reakcję badanych gatunków. Gatunki, które pozostały odporne na zastosowane izolaty to: *N. benavidesii*, *N. glauca*, *N. knightiana*, *N. noctiflora*, *N. otophora* i *N. raimondii*. W wyniku zastosowania amerykańskich izolatów PVY (YMM, YMN i YNN) w badaniach 40 gatunków *Nicotiana* stwierdzono 5 (*N. benavidesii*, *N. glauca*, *N. raimondii*, *N. tomentosiformis* i *N. wigandioides*), które okazały się odporne na te izolaty (9). Badania dzikich gatunków *Nicotiana* z uwzględnieniem trzech izolatów nekrotycznych: PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>NZ</sup>, PVY<sup>NTN</sup> wykazały, że reakcja odpornościowa niektórych gatunków zależy od użytego izolatu. (32). Zmienna w porównaniu z poprzednimi badaniami była też liczba testowanych gatunków, co było spowodowane m.in. włączeniem do rodzaju *Nicotiana* nowych gatunków, takich jak *N. africana* (55) i *N. mutabilis* (76) i dodaniem ich do kolekcji IUNG.

Szczegółowe badania nad odpornością dzikich gatunków *Nicotiana* na wirusa Y ziemniaka wykonano przy użyciu sześciu izolatów PVY, które należały do trzech grup: PVY<sup>NW</sup>, PVY<sup>NZ</sup> i PVY<sup>NTN</sup>, były zróżnicowane serologicznie oraz pod względem zdolności przełamania różnych źródeł odporności (30). Uzyskane wyniki wykazały różną reakcję, która zależała zarówno od gatunku, jak i użytego izolatu PVY. W obrębie rodzaju *Nicotiana* najwięcej gatunków z wysoką odpornością na PVY należało do sekcji *Paniculatae*. *Nicotiana raimondii*, *N. knightiana* w formie di- i tetraploidalnej oraz tetraploidalna forma *N. glauca* wykazały odporność na wszystkie badane izolaty. W przypadku diploidalnej formy *N. glauca* nie wystąpiły objawy chorobowe, ale testy DAS-ELISA wykazały obecność wirusa w roślinach zakażanych sokiem PVY<sup>NZ</sup>. Izolat PVY<sup>NZ</sup> poraził również *N. benavidesii* w postaci chlorotycznych pierścieni. Na pozostałe izolaty gatunek ten był odporny (30). Prace nad wykorzystaniem odporności w hodowli prowadził Berbeć (5), który wykonał krzyżowanie tytoniu uprawnego (*N. tabacum* 2n = 48) z trzema gatunkami sekcji *Paniculatae* (2n = 24): *N. benavidesii*, *N. knightiana* i *N. raimondii*. Formy mieszańcowe *N. knightiana* × *N. tabacum* i *N. raimondii* × *N. tabacum* wytwarzały prawie całkowicie nieżywotny pyłek, co wynikało z niestabilności cytogenetycznej. Częściowo płodne formy seskwidiploidane uzyskano w wyniku krzyżowania tetraploidalnej formy *Nicotiana tabacum* cv. BP 210 z *N. benavidesii*. Stanowiły one komponent mateczny do krzyżowania wstecznego z tytoniem uprawnym. W uzyskanych z samozapylenia w dalszych etapach hodowli linie mieszańcowe przejawiały odporność na PVY (3). Badania Doroszewskiej i Depty (30) wykazały, że wysoką odporność na trzy z sześciu badanych izolatów posiadały *N. solanifolia*, *N. cordifolia*, *N. otophora*, *N. setchellii* i *N. petunioides*. Pozostałe izolaty PVY w przypadku tych gatunków powodowały wystąpienie słabych objawów chorobowych, głównie przejaśnień nerwów i plam chlorotycznych, choć wirus był obecny w roślinie, co potwierdzono testem DAS-ELISA. Zróżnicowanie odporności wykazano w obrębie badanych odmian gatunku *N. rustica*. Odporna na trzy izolaty była odmiana *N. rustica* var. *brasilia*, na dwa izolaty – *N. rustica* var. *pumila*, a na jeden – *N. rustica* var. *neuchestii*. Pozostałe odmiany *N. rustica* zostały porażone wszystkimi izolatami PVY, ale objawy miały charakter tolerancji. Natomiast u wszystkich 9 badanych odmian botanicznych *N. tabacum* wystąpiła nekroza nerwów, co świadczy o ich silnej podatności na PVY. Nekrozy nerwów, po zastosowaniu wszystkich izolatów, wystąpiły też u gatunku *N. repanda*. Wyniki badań wskazują, że aż 26 gatunków wykazuje na wszystkie użyte izolaty jedynie cechy tolerancji w postaci przejaśnień nerwów, plam i pierścieni chlorotycznych oraz deformacji i przebarwień mozaikowych (30). Gatunek *Nicotiana mutabilis* oraz gatunki pokrewne – *N. alata* i *N. forgetiana* – były przedmiotem dalszych badań Depty i in. (19). Użycie dwóch izolatów PVY o zróżnicowanej zjadliwości wykazało, że gatunki te nie reagują nekrozą nerwów, co może świadczyć o ich tolerancji. U *N. mutabilis* i *N. alata* wystąpiły jedynie przejaśnienia nerwów, zaś gatunek *N. forgetiana* posiadał dodatkowo pomarszczone liście i objawy mozaikowe. Wykonane badania molekularne pozwoliły stwierdzić, że

nie amplifikują one markera Nsyl-eIF4E1, który jest związany z genem podatności *Va* na PVY. Tolerancja w obrębie tych dzikich gatunków *Nicotiana* różni się zatem od tolerancji odmian uprawnych *N. tabacum*, które amplifikowały ten marker (20, 56).

Spośród wszystkich badanych obiektów należących do rodzaju *Nicotiana* na szczególną uwagę zasługuje gatunek *Nicotiana africana*, który wykazał całkowitą immunię na wszystkie badane izolaty (28, 30, 31, 52). Gatunek ten należy do sekcji *Suaveolentes* i posiada 46 chromosomów. Jest to wolno rosnący krzew o białych kwiatach osiągający wysokość od 1 do 1,5 m. W warunkach naturalnych występuje jedynie w Afryce, gdzie preferuje miejsca zacienione i skaliste (29). Gatunek ten jest odległy filogenetycznie od *N. tabacum*, co skutkuje problemami w uzyskaniu mieszańców międzygatunkowych. Bariery krzyżowalności w mieszańcu *N. tabacum* × *N. africana* obejmują zamieranie siewek mieszańcowych w wyniku brązowienia systemu korzeniowego (79). Prace hodowlane z wykorzystaniem pięciu odmian tytoniu uprawnego oraz gatunku *N. africana* jako komponentu ojcowskiego podjęła Doroszevska (33). Uzyskała ona dużą liczbę nasion mieszańcowych, które po wysianiu charakteryzowały się wysokim stopniem śmiertelności siewek. Rozwiązaniem problemu niezżywołności okazało się zastosowanie kultur *in vitro* liścieni i regeneracja roślin mieszańcowych na odpowiednich pożywkach. Jednakże uzyskane formy amfihaploidalne były niepłodne ze względu na niską koniugację chromosomów (27). Ponowne zastosowanie kultur *in vitro* pozwoliło na podwojenie liczby chromosomów, które następowało spontanicznie w czasie trwania kultur tkankowych (26). W wyniku prowadzonych prac hodowlanych uzyskano linię BPA, która została wyprowadzona z krzyżówki pomiędzy podatną na PVY odmianą BP-210 i gatunkiem *N. africana*. Badania odpornościowe z wykorzystaniem różnych izolatów PVY wykazały, że linia BPA jest tolerancyjna, gdyż objawy chorobowe ograniczają się jedynie do plam chlorotycznych na blaszce liściowej i przejaśnień nerwów, natomiast nigdy nie zaobserwowano nekrozy nerwów, nawet po zastosowaniu silnie wirulentnych izolatów PVY<sup>NTN</sup> (28, 34, 45). Badania molekularne z wykorzystaniem markera S10760 wykazały, że linia BPA amplifikuje gen podatności *Va*, co może świadczyć o tym, że mechanizm tolerancji linii BPA jest niezależny od delekcji w obrębie genu *EIF4E*. Ponadto ten rodzaj odporności nie zabezpiecza przed rozprzestrzenianiem się wirusa w roślinie, tak jak w przypadku odmian z odpornością typu *va*, a jedynie zabezpiecza przed wystąpieniem nekroz nerwów (45). Szczegółowe badania dziedziczenia cechy tolerancji w odmianie BPA wykazały, że ma ona charakter recesywny (44). Wyniki powyższych badań dowodzą, że poziom odporności linii hodowlanej jest mniejszy niż gatunku dzikiego. Może to wynikać z niepełnego transferu czynników odporności od *N. africana*, co wskazywałoby na jej wielogenowy charakter bądź z niekorzystnego wpływu genów z genomu *N. tabacum* obniżającego ekspresję cechy odporności (35, 51).

Prace hodowlane z wykorzystaniem *N. africana* prowadził też Wernsmann (86), który uzyskał linię addycyjną NC152 zawierającą parę homologicznych chromosomów od *N. africana*. Linia ta nie wykazywała pełnej odporności na PVY, jednak

zapewniała częściową ochronę przed nekrozami. Dodatkowe chromosomy pochodzące od *N. africana* w linii addycyjnej NC152 zostały następnie oznakowane zmutowanym transgenem *dhfr* warunkującym odporność na metotreksat (10). Uzyskana w ten sposób linia została wykorzystana przez Lewisa (51) do oceny stopnia transferu genów pochodzących od *N. africana* do tytoniu uprawnego. W tym celu zastosowano zarówno metody klasycznej hodowli poprzez krzyżowanie z podatną odmianą Petite Havana, jak również z zastosowaniem kultur tkankowych. Następnie z pokolenia BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> badacze wyselekcjonowali obiekty odporne na PVY NN i zawierające 48 chromosomów, które poddali krzyżowaniu z podatną odmianą K326 w celu przeniesienia fragmentu *Nafr* odpowiedzialnego za odporność na PVY. Na bazie odmiany K326 Lewis (50) uzyskał prawie izogeniczne linie posiadające różne kombinacje odporności i tolerancji na PVY, obejmujące zarówno recesywny gen *va*, jak i fragment *Nafr*. Badania odpornościowe wykazały zróżnicowany stopień odporności uzyskanych linii, który zależał od zjadliwości użytego izolatu PVY, a cecha ta wykazywała charakter częściowo dominujący (51).

Przedstawione powyżej badania wskazują, że wykorzystanie gatunku *N. africana* w hodowli tytoniu pozwala uzyskać linie hodowlane o wyższym poziomie odporności lub tolerancji na PVY. Zależy to w dużej mierze od zastosowanej odmiany tytoniu (34, 51). W związku z tym Depta i Doroszevska (21) podjęły prace mające na celu połączenie w wyniku klasycznej hodowli odporności pochodzącej od *N. africana* z odpornością typu *va*. Jako komponent mateczny zastosowano dwie odmiany, VAM i Wiślicę, które wykazywały najlepszą odporność na zastosowane izolaty PVY spośród odmian posiadających gen recesywny *va* (20, 28, 45, 57). W trakcie prac hodowlanych udoskonalono metody kultur *in vitro* pozwalające na szybsze i wydajniejsze uzyskiwanie podwojonych haploidów. W tym celu zastosowano kulturę rdzeni, a posłużenie się cytometrią przepływową znacznie skróciło proces oceny ploidalności otrzymanych form mieszańcowych. Uzyskane w ten sposób linie mieszańcowe, niosące dwa czynniki odporności na PVY, stanowią cenne komponenty do hodowli odpornościowej (21).

### Odporność uzyskana w wyniku transformacji genetycznej

Opisane powyżej metody hodowli klasycznej oparte są na krzyżowaniu międzyodmianowym lub międzygatunkowym, a także na mutagenезie. Krzyżowanie międzygatunkowe jest często trudne lub wręcz niemożliwe ze względu na bariery krzyżowalności. Ponadto w wyniku tego procesu przenoszone są nie tylko pożądane geny, ale również geny sprzężone, które mogą mieć negatywny wpływ na cechy mieszańca. Hodowla klasyczna to proces długotrwały, oparty na selekcji i nie zawsze zakończony sukcesem. Metodą alternatywną jest transformacja genetyczna polegająca na wprowadzeniu do komórki obcego materiału genetycznego (tzw. transgenu) w sposób szybki i precyzyjny, nawet z organizmów odległych filogenetycznie. Uży-



skane w ten sposób organizmy, określane jako organizmy genetycznie modyfikowane (GMO, ang. *genetically modified organism*), posiadają nowe, pożądane cechy, w tym odporność na patogeny (18).

Transformacja genetyczna może być przeprowadzona wieloma metodami, ale za najbardziej skuteczny sposób dla roślin dwuliściennych uważa się wykorzystanie patogenicznej bakterii glebowej *Agrobacterium tumefaciens*, która posiada system genetycznej kolonizacji roślin w postaci tumorowego wzrostu guzów na szyjce korzeniowej oraz *A. rhizogenes*, która powoduje nadmierny rozrost korzeni. Powstawanie komórek tumorowych jest wynikiem przeniesienia fragmentu plazmidu bakteryjnego, tzw. Ti-plazmidu (Ti, ang. *tumor inducing*) do wnętrza komórek roślinnych. Przenoszony fragment DNA, tzw. DNA transferowy (T-DNA), przenika przez uszkodzoną ścianę komórkową do jądra komórkowego i przyłącza się do DNA rośliny. *Agrobacterium tumefaciens* rozpoznaje substancje fenolowe wydzielane przez uszkodzone komórki roślinne i kolonizuje fragment uszkodzonej tkanki. Następuje aktywacja i ekspresja wielu genów wirulencji bakterii, co umożliwia transport T-DNA do jądra komórkowego (61). W przypadku tytoniu najczęściej stosowaną metodą transformacji jest metoda krążków liściowych (40). W metodzie tej pierwszym etapem jest inokulacja eksplantatu pochodzącego ze sterylnej hodowli w specjalnie przygotowanej kulturze *Agrobacterium*, która w obszarze T-DNA plazmidu ma wklonowany konstrukt genowy składający się zazwyczaj z pożądanego transgeny i genu selekcyjnego (odporność na antybiotyki), a czasem również genu reporterowego (np. białka zielonej fluorescencji GFP, lucyferazy lub  $\beta$ -glukuronidazy). Po zakończeniu inkubacji i odpłukaniu ekplantatów w wodzie destylowanej są one wykładane na pożywkę regeneracyjną bez antybiotyków na okres kilku dni, w celu wklonowania konstrukt do komórek roślinnych. Po tym czasie krążki liściowe są przenoszone na taką samą pożywkę regeneracyjną, ale zawierającą dodatkowo antybiotyki (kanamycyna i karbenicylina), które pozwalają na eliminację bakterii i selekcję transformantów.

Ze względu na to, że tytoń łatwo ulega transformacji za pomocą bakterii *A. tumefaciens*, podjęto próby wykorzystania tej metody do uzyskania roślin transgenicznych tytoniu odpornych na choroby wirusowe, poprzez transformowanie ich genami pochodzącymi od wirusa. Odporność ta, zwana odpornością pochodzącą od patogenu (PDR, ang. *Pathogen derived resistance*), opiera się na naturalnym zjawisku krzyżowym (ang. *Cross-protection*), gdzie inokulacja roślin słabymi szczepami wirusa zabezpiecza je przed szczepami bardziej wirulentnymi (71). Zastosowanie niezmodyfikowanych patogenów powodowało skutki uboczne, dlatego opracowano metodę wprowadzenia wybranych genów patogenu do genomu biorcy (69). W tym celu wykorzystywano m.in. geny kodujące białko płaszczka wirusa (CP, ang. *coat protein*) oraz gen kodujący wirusową replikazę (11, 64). Transformacja tytoniu w kierunku odporności na PVY była przedmiotem wielu badań. Sudarsono i in. (77) wykorzystali gen białka płaszczka PVY (CP) pochodzącego z chilijskiego izolatu PVY i uzyskali jedynie 5–12% roślin pokolenia R<sub>0</sub> uznawanych za odporne, a Kollar i in. (43) użyli węgierskiego

izolatu PVY-H i uzyskali w pokoleniu R<sub>1</sub> rośliny o dużej zmienności pod względem odporności na PVY-H. Zastosowanie genu białka płaszczka wirusa mozaiki sałaty LMVCP do transformacji odmiany Xanthi pozwoliło wyodrębnić dwie linie spośród pięciu badanych, które były całkowicie odporne, a wśród pozostałych znaczna część nie miała objawów chorobowych (23). Park i in. (63) użyli cDNA genu replikazy PVY w transformacji tytoniu odmiany Burley 21 i uzyskali wysoki wskaźnik roślin odpornych.

Transformację tytoniu metodą krążków liściowych na pożywcę selekcyjnej z kanamycyną w celu uzyskania odporności na PVY przeprowadziła również Doroszevska (31). Do badań wykorzystano cztery odmiany uprawne w typie papierosowym jasnym, posiadające dobre cechy jakościowe, lecz silnie podatne na PVY: MacNair 944, K326, By103 i AC Gayed. Transformacja była prowadzona przy użyciu konstrukcji pROKY, która niosła zmodyfikowany gen polimerazy PVY i była przygotowana w dwóch orientacjach: sensownej i antysensownej, a także przy użyciu konstrukcji LMVCP, która niosła gen płaszczka wirusa mozaiki sałaty. Efektywność transformacji wynosiła 40–50% regeneracji roślin posiadających transgen. Uzyskane wyniki testów odpornościowych wskazały, że 17,6% roślin pokolenia T<sub>0</sub> posiadało wysoką odporność na PVY i nie zaobserwowano wyraźnych różnic w zależności od użytej konstrukcji i odmiany. Nieco bardziej zróżnicowane wyniki pod względem transferu transgeny i stopnia odporności uzyskano dla pokolenia T<sub>1</sub>. Najlepsze kiełkowanie i wzrost roślin zaobserwowano dla roślin pochodzących z transformacji konstrukcją LMVCP. Stopień odporności roślin zależał od odmiany i był najwyższy dla linii AC Gayed i MacNair 944. Wysoką odporność na PVY wykazywało ogółem 35,5% roślin pokolenia T<sub>1</sub>. Również pokolenie T<sub>2</sub> wykazywało zróżnicowanie pod względem obecności transgeny, jak i stopnia odporności na PVY. Ogółem 47,3% roślin pokolenia T<sub>2</sub> było wysoce odpornych na PVY, a wśród nich były linie, gdzie odporność przekraczała 80%. Uzyskane przez Doroszevską (31) wyniki w pokoleniach T<sub>0</sub>-T<sub>2</sub> wszystkich linii z udziałem trzech konstrukcji wskazują na wzrost odporności roślin transgenicznych na PVY.

Stabilność cechy odporności na PVY w pokoleniach T<sub>2</sub>-T<sub>4</sub> była przedmiotem badań Doroszevskiej i Czubackiej (28). W tym celu użyto trzech izolatów PVY o różnej zjadliwości. Najskuteczniejszą ochronę zapewniły konstrukcje LMVCP i ROKY2, a najmniejszą – ROKY1. Uwzględniając odmiany, najlepiej wypadły odmiany AC Gayed i MacNear 944, a najgorzej – K326. W pokoleniu T<sub>4</sub> linia MacNair 944 LMVCP była odporna na wszystkie zastosowane izolaty, a odmiana AC Gayed niestety uległa częściowemu porażeniu w postaci nekroz nerwów. Kolejne testy odpornościowe na czterech transgenicznych liniach tytoniu w pokoleniach T<sub>2</sub>-T<sub>4</sub> zostały wykonane przy użyciu trzech nekrotycznych szczepów PVY (18). Uzyskane wyniki były zbieżne z uzyskanymi wcześniej, wskazując, że najlepszą ochronę zapewnia konstrukcja LMVCP i ROKY2 (28). Badania molekularne wykazały stabilizację dziedziczenia transgeny w kolejnych pokoleniach. Jednakże jego obecność nie za-

wsze zapewniała ochronę przed PVY. Rośliny transgeniczne z konstrukcją ROKY1 były odporne na PVY<sup>NW</sup> w 60% w pokoleniu T<sub>2</sub>, ale już w pokoleniu T<sub>4</sub> tylko 2,7% osobników było odpornych na ten izolat PVY. Utrata odporności może być związana ze wzrostem metylacji wstawki w kolejnych pokoleniach i jest ona dziedziczona w kolejnych pokoleniach. Rośliny transgeniczne z sensowną wstawką ROKY1 były bardziej podatne na PVY, co oznacza, że transgen w orientacji antysensownej lepiej indukuje wyciszanie RNA wirusowego i w ten sposób nie dopuszcza do namnażania się patogenu. Innym wyjaśnieniem braku odporności przy obecności transgeny może być efekt pozycji, czyli miejsce włączenia wstawki (8). Jeżeli transgeny zostaną włączone w region euchromatyny, to na jego ekspresję mogą wpływać sekwencje regulatorowe sąsiednich genów gospodarza. Natomiast włączenie transgeny w region heterochromatyny, jak również wewnątrz lub w pobliżu powtarzających się sekwencji DNA powoduje jego inaktywację (75). Ważna jest również liczba kopii transgeny w tym samym miejscu integracji. Inaktywacji mogą podlegać transgeny, które integrują po 2 lub więcej sztuk do jednego miejsca na chromosomie, gdyż mogą tworzyć bezpośrednie lub odwrócone powtórzenia, co powoduje efekt wyciszenia (54, 75).

Ocena roślin transgenicznych uzyskanych przez Wu i in. (88) pod kątem cech morfologicznych i agronomicznych, a także jakości i składu chemicznego wysuszonych liści wskazują na brak negatywnego wpływu transgeny na te cechy. Dodatkowo linie transgeniczne charakteryzowały się wyższym plonowaniem. Uzyskane przez Doroszewską (31) linie transgeniczne były również ocenione pod względem cech biologicznych i agronomicznych. Genetyczne modyfikacje nie spowodowały zmian w mejozie i żywotności pyłku. Poszczególne linie transgeniczne tylko w niewielkim stopniu różniły się pod względem cech morfologicznych i użytkowych od swoich nietransgenicznych odpowiedników (17).

Rozwój metod inżynierii genetycznej pozwolił na bardzo precyzyjną modyfikację genomów w procesie edycji genów opartym na systemie CRISPR/Cas9 (ang. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* – CRISPR associated). System ten polega na cięciu podwójnej helisy DNA w ściśle określonym miejscu, co powoduje delecje lub zastąpienie wybranego fragmentu DNA innym (16). Ruyi i in. (68) zastosowali metodę CRISPR-Cas9 do uzyskania odporności na PVY w odmianie LJ911, która charakteryzowała się dobrymi cechami jakościowymi, ale była podatna na PVY. W wyniku prawidłowo przeprowadzonej edycji genów został wyłączony gen podatności *Va*, a uzyskane linie były odporne na PVY.

Wykorzystanie inżynierii genetycznej pozwala na uzyskanie odpornych na PVY odmian lub linii hodowlanych. Problemem może być jednak możliwość zastosowania ich w uprawie, ze względu na regulacje prawne dotyczące GMO, według których w niektórych krajach jest możliwa uprawa GMO, a w innych jest to zabronione (78). Z tego powodu linie transgeniczne uzyskane przez Doroszewską (31) były badane jedynie w ściśle kontrolowanych i zabezpieczonych warunkach szklarniowych.

Edytowana odmiana LJ911 również nie została wykorzystana komercyjnie, a jedynie stanowi potencjalne źródło odporności w kolekcji tytoniu (68).

### Podsumowanie

Badania dotyczące PVY, odporności tytoniu na ten wirus, jak też prace hodowlane mające na celu uzyskanie form odpornych, były prowadzone przez wielu badaczy z wykorzystaniem różnych metod. Nie uzyskano jak dotąd odmiany w pełni immunnej na wszystkie izolaty PVY, ze względu na zmienność wirusa i jego zdolność do przełamania wprowadzanych źródeł odporności. Nowoczesne metody i techniki badawcze pozwalają na coraz lepsze rozpoznanie wirusa i sposobów jego ograniczania. Metody hodowli klasycznej, wspomagane inżynierią genetyczną, dają realną szansę na podniesienie odporności odmian na PVY i tym samym wskazują na potrzebę prowadzenia dalszych prac badawczych w tym kierunku.

### Literatura

1. A c o s t a - L e a l R., X i o n g Z.: Complementary functions of two recessive R-genes determine resistance durability of tobacco "Virgin A Mutant" (VAM) to Potato virus Y. *Virology*, 2008, **379**: 275-283.
2. A n o G., B l a n c a r d D., C a i l l e t a u B.: Mise au point sur la résistance recessive aux souches nécrotiques du virus Y de la pomme de terre (PVY) présente chez *Nicotiana tabacum*. *Ann. du Tabac*, 1995, **27**: 35-42.
3. B e r b e ć A., G ł a ż e w s k a Z.: Transfer of resistance to potato virus Y from *Nicotiana benavidesii* Goodspeed to *N. tabacum* L. *Genetica Polonica*, 1988, **29(3-4)**: 323-333.
4. B e r b e ć A., M a d e j A.: Obecna sytuacja i perspektywy uprawy tytoniu w Polsce na tle świata i Unii Europejskiej. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 2012, **31(5)**: 51-67.
5. B e r b e ć A.: Chromosome pairing and pollen fertility in the interspecific F<sub>1</sub> Hybrids *Nicotiana tabacum* L. x *N. benavidesii* Goodspeed, *N. knightiana* Goodspeed x *N. tabacum*, and *N. raimondii* Macbride x *N. tabacum*. *Genetica Polonica*, 1987, **28(3)**: 263-269.
6. B i s k u p J., C z o p W., D r a g o n J., D u d e k M., E c h t M., J a n k o w s k i F., K w i e c i ń s k i W., M a t u s i e w i c z E., P o n i e w i e r s k i F., R o m a n T., R ó ż a ń s k i J., S k i e n d z i e l e w s k i J., T r o j a n J., W ę g r z y n S., W i e r z b a M., W i r o w s k i Z.: Tytoń – uprawa, hodowla, fermentacja. PWRiL, Warszawa 1969.
7. B r o w n i n g K.S., B a i l e y - S e r r e s J.: Mechanism of cytoplasmic mRNA translation. *Arab. Book*, 2015, **13**: e 0176.
8. B r u m i n M., S t u k a l o v S., H a v i v S., M u r u g a n a n t h a m M., M o s k o v i t z Y., B a t u m a n O., F e n i g s t e i n A., M a w a s s i M.: Post-Transcriptional Gene Silencing and Virus Resistance in *Nicotiana benthamiana* Expressing a Grapevine Virus a Mini-Replicon. *Transgenic Research*, 2009, **18**: 331-345.
9. B u r k L.G., G o o d i n g G.V., C h a p l i n J.F.: Reaction of *Nicotiana* species and cultivars or breeding lines of *Nicotiana tabacum* to three strains of potato virus Y. *Tobacco Science*, 1982, **28**: 86-88.
10. C a m p b e l l K.G., W e r n s m a n E.A., F i t z m u r i c e W.P., B u r n s J.A.: Construction of designer chromosome in tobacco. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, **87**: 837-842.

11. Carr J.P., Zaitlin M.: Resistance in transgenic plants expressing a non-structural gene sequence of markedly reduced virus replication. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1991, **4**: 579-585.
12. Carstens H., Seehofer F.: How Virginia SCR is obtained and cultivated in the Federal Republic of Germany. *CORESTA*, **3**: 39-43.
13. Chrzanowska M.: Differentiation of potato virus Y (PVY) isolates. *Phytopathologia Polonica*, 1994, **8**: 15-20.
14. Cooper J.I., Jones A.T.: Responses of plants to viruses: proposals for the use of terms. *Phytopathology*, 1983, **73**: 127-128.
15. Crosslin J.M.: PVY: An Old Enemy and a Continuing Challenge. *American Journal of Potato Research*, 2013, **90**: 2-6.
16. Czarnek M., Bereta J.: System CRISPR-Cas – od odporności bakterii do inżynierii genomowej. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (online), 2016, **70**: 901-916.
17. Czubačka A., Doroszevska T.: Estimating agronomic traits of transgenic tobacco lines. *Euphytica*, 2010, **172**: 35-47.
18. Czubačka A., Doroszevska T.: Odporność transgeniczných linií tytoniu na vírus Y zemiňniaka (PVY). *Biotechnologia*, 2010, **2(89)**: 72-82.
19. Depta A., Doroszevska T., Czubačka A.: Resistance Response of the Recently Discovered Species *Nicotiana gluticola* to Potato virus Y (PVY) and Tomato spotted wilt virus (TSWV) Compared to Other Sources of Resistance. *Agronomy*, 2021, **11(8)**, 1617.
20. Depta A., Doroszevska T., Czubačka A.: Zróżnicowanie reakcji odpornościowej wybranych odmian tytoniu (*Nicotiana tabacum*) w zależności od użytego izolatu wirusa Y zemiňniaka (PVY). *Polish Journal of Agronomy*, 2020, **42**: 3-13.
21. Depta A., Doroszevska T.: Development and cytometric evaluation of interspecific F<sub>1</sub> hybrids *Nicotiana tabacum* x *N. africana*. *Polish Journal of Agronomy*, 2019, **38**: 3-14.
22. Diaz-Pendon J.A., Truniger V., Nieto C., Garcia-Mas J., Bendahmane A., Aranda M.A.: Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Molecular Plant Pathology*, 2004, **5(3)**: 223-233.
23. Dinant S., Blaise F., Kusiak C., Astier-Manifacier S., Albouy J.: Heterologous resistance to potato virus Y in transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of lettuce mosaic virus. *Phytopathology*, 1993, **83**: 818-824.
24. Dinant S., Kusiak C., Cailleteau B., Verrier J.L., Chupeau M.C., Chupeau Y., Le T.A.H., Delon R., Albouy J.: Field resistance against potato virus Y infection using natural and genetically engineered resistance genes. *European Journal of Plant Pathology*, 1998, **104**: 377-382.
25. Dlugé K.L., Song Z., Wang B., Steede W., Xiao B., Liu Y., Dewey R.E.: Characterization of *Nicotiana tabacum* genotypes possessing deletion mutations that affect potyvirus resistance and the production of trichome exudates. *BMC Genomics*, 2018, **19**, 484.
26. Doroszevska T., Berbeć A.: Cytogenetical investigations of polyploid interspecific hybrids of *Nicotiana africana* with different cultivars of *N. tabacum*. *Journal of Genetics & Breeding*, 2000, **54**: 77-82.
27. Doroszevska T., Berbeć A.: Chromosome pairing and microsporogenesis in interspecific F<sub>1</sub> hybrids of *Nicotiana africana* with different cultivars of *N. tabacum*. *Journal of Genetics & Breeding*, 1996, **50**: 75-82.
28. Doroszevska T., Czubačka A.: Ocena odporności odmian i linii hodowlanych tytoniu na wirusa Y zemiňniaka (PVY). *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 2008, **13**: 29-42.
29. Doroszevska T., Depta A., Czubačka A.: Album of *Nicotiana* species. Institute of Soil Science and Plant Cultivation. National Research Institute, Puławy, 2009, ss. 373.
30. Doroszevska T., Depta A.: Resistance of wild *Nicotiana* species to different PVY isolates. *Phytopathologia*, 2011, **59**: 9-24.

31. Doroszevska T.: Krzyżowanie oddalone i transformacja genetyczna w uzyskiwaniu odporności tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) na wirusa Y ziemniaka (PVY). Monografie i Rozprawy Naukowe, Puławy 2004, **9**: 1-135.
32. Doroszevska T.: Potential sources of resistance to three strains of potato virus Y in the genus *Nicotiana*. Inf. Bull. CORESTA Congress, New Orleans, 2002, p. 29.
33. Doroszevska T.: Przełamywanie barier niezżywności i bezpłodności międzygatunkowych mieszańców *Nicotiana tabacum* × *Nicotiana africana* Merxm. metodą kultur tkankowych. Prace Ogródo Botanicznego PAN, 1994, **5/6**: 465-472.
34. Doroszevska T.: Transfer of tolerance to different *Potato virus Y* (PVY) isolates from *Nicotiana africana* Merxm. To *Nicotiana tabacum* L. Plant Breeding, 2010, **129(1)**: 76-81, doi: 10.1111/j.1439-0523.2009.01634.x
35. Doroszevska T.: Uzyskanie stabilnych linii hodowlanych tytoniu z czynnikami odporności na różne izolaty wirusa Y ziemniaka (PVY) od dzikiego gatunku *Nicotiana africana* Merxm. Biuletyn IHAR, 2007, **244**: 273-287.
36. Dougherty W.G., Carrington J.C.: Expression and function of potyviral gene products. Annual Review of Phytopathology, 1988, **26**: 123-143.
37. Drake J.W.: Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. Proceeding of the National Academy of Sciences of The United States of America (PNAS), 1993, **90**: 4171-4175.
38. Gładzewska Z.: Odporność dzikich gatunków *Nicotiana* oraz odmian *N. tabacum* i *N. rustica* na nekrotyczne szczepy wirusa Y. Mat. XVII Sesji Nauk., IOR Poznań, 1977, s. 277-287.
39. Hane D.C., Hamm P.B.: Effects of seedborne potato virus Y infection in two potato cultivars expressing mild disease symptoms. Plant Disease, 1999, **83(1)**: 43-45.
40. Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N.I., Eichholtz D., Rogers S.G., Fraley R.T.: A simple and general method for transferring genes into plants. Science, 1985, **227**: 1229-1231.
41. Julio E., Cotucheau J., Decorps C., Volpatti R., Sentenac C., Candresse T., Dorlhac de Borne F.: A Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) is responsible for the 'va' tobacco recessive resistance to potyviruses. Plant Molecular Biology Reporter, 2015, **33**: 609-623.
42. Koelle G.: Genetische Analyse einer Y-virus (Rippen-braune) resistenten Mutante der Tabaksorte Virgin A. Der Zuchter 1961, **31**: 71-72.
43. Kollar A., Thole V., Dalmay T., Salamon P., Balazs E.: Efficient coat protein-mediated protein mediated protein induced by integrated Potato Virus Y coat protein gene in tobacco. Biochimie, 1993, **75**: 623-628.
44. Korbecka-Glinka G., Czubacka A., Depta A., Doroszevska T.: Inheritance of *Potato virus Y* tolerance introgressed from *Nicotiana africana* to cultivated tobacco. Polish Journal of Agronomy, 2017, **31**: 39-44, doi: 10.26114/pja.iung.343.2017.31.06
45. Korbecka-Glinka G., Czubacka A., Przybyś M., Doroszevska T.: Resistance vs. tolerance to Potato virus Y in tobacco – comparing effectiveness using virus isolates from Central Europe. Breeding Science, 2017, **67**: 459-465.
46. Lacroix C., Glais L., Kerlan C., Verrier J.L., Jacquot E.: Biological characterization of French *Potato virus Y* (PVY) isolates collected from PVY-susceptible or – resistant tobacco plants possessing the recessive resistance gene *va*. Plant Pathology, 2010, **59**: 1133-1143.
47. Lacroix C., Glais L., Verrier L., Charlier C., Lorencetti C., Jacquot E.: Impact of tobacco recessive resistance gene *va* on biological properties of Brazilian Potato virus Y (PVY) isolates. Plant Pathology, 2011, **60**: 1048-1054.
48. Lacroix C., Glais L., Verrier J.L., Jacquot E.: Effect of passage of a potato virus Y isolate on a line of tobacco containing the recessive resistance gene *va 2* on the development of isolates capable of overcoming alleles 0 and 2. European Journal of Plant Pathology, 2011, **130**, 259-269.
49. Le Romancer M., Kerlan C., Nedellec M.: Biological characterization of various geographical isolates of Potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. Plant Pathology, 1994, **43(1)**: 138-144.

50. Lewis R.S.: Evaluation of *Nicotiana tabacum* genotypes possessing *Nicotiana africana*-derived genetic tolerance to *Potato Virus Y*. *Crop Science*, 2007, **47**: 1975-1984, doi: 10.2135/cropsci2007.01.0001.
51. 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, **110**: 678-687, doi: 10.1007/s00122-004-1893-4.
52. 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. *Tobacco Science*, 1980, **24**: 141-142.
53. Masuta C., Nishimura M., Morishita H., Hataya T.: A single amino acid change in viral genome-associated protein of potato virus Y correlates with resistance breaking in 'Virgin A Mutant' tobacco. *Phytopathology*, 1999, **89**: 118-123.
54. Matzke M.A., Birchler J.A.: RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nature*, 2005, **6**: 24-35.
55. Merxmüller H., Buttler L.P.: *Nicotiana* in der Anfrikanischen Namib-Ein Pflanzen geographisches und phylogenetisches, 1975 Ratsel. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München*, **12**: 91-104.
56. Michel V., Julio E., Candresse T., Cotucheau J., Decorps C., Volpatti R., Moury B., Glais L., Dorlhac de Borne F., Decroocq V., German-Retana S.: *NTPNI*: a RPP8-like *R* gene required for Potato virus Y-induced veinal necrosis in tobacco. *The Plant Journal*, 2018, **95**: 700-714.
57. Michel V., Julio E., Candresse T., Cotucheau J., Decorps C., Volpatti R., Moury B., Glais L., Jacquot E., Dorlhac de Borne F., Decroocq V., Gallois J.L., German-Ratana S.: A complex eIF4E locus impacts the durability of *va* resistance to Potato virus Y in tobacco. *Molecular Plant Pathology*, 2019, **20**(8): 1051-1066.
58. Miller R.D.: Registration of 'TN86' burley tobacco. *Crop Science*, 1987, **27**: 365-366.
59. Noguchi S., Tajima T., Yamamoto Y., Kubo T.: Identification of RAPD markers linked to potato virus Y resistance gene in tobacco. *Bull. Spec. CORESTA Congress, Yokohama*, 1996, p. 160, P9.
60. Noguchi S., Tajima T., Yamamoto Y., Ohno T., Kubo T.: Deletion of a large genomic segment in tobacco varieties that are resistant to potato virus Y. *Molecular Genetics and Genomics*, 1999, **262**: 822-829.
61. Orlikowska T.: Transformacja roślin za pomocą wektorów *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnologia*, 1994, **1**(24): 32-43.
62. Palukaitis P., Carr J.P.: Plant resistant responses to viruses. *Journal of Plant Pathology*, 2008, **90** (2): 153-171.
63. Park E.K., Kim Y.H., Paek H., Chae S.Y., Kang S.W.: Characteristics of resistance to potato virus Y in transgenic tobacco plants mediated with complementary DNA (cDNA) of PVY replicase genes. *Bull. Spec. CORESTA Congress, Yokohama*, 1996, p. 162, P11.
64. Powell-Abel P., Nelson R.S., Barun De, Hoffmann N., Rogers S.G., Fraley R.T., Beachy R.N.: Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 1986, **232**: 738-743.
65. Przybyś M., Doroszevska T., Berbeć A.: Point mutation in the Viral genome-linked protein (VPg) of Potato virus Y probably correspond with ability to overcome resistance of tobacco. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 2013, **11** (3&4): 986-989.
66. Robaglia C., Caranta C.: Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science*, 2006, **11**(1): 40-45.
67. Robaglia C., Durand-Tardif M., Tronchet M., Boudazin G., Astier-Manificier S., Casse-Delbart F.: Nucleotide Sequence of Potato Virus Y (N Strain) Genomic RNA. *Journal of General Virology*, 1989, **70**: 35-947.

68. Ruyi R., Qiang Z., Futai N., Qiu J., Xiuqing W., Jicheng W.: Breeding for PVY resistance in tobacco LJ911 using CRISPR/Cas9 technology. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2021, **21(1)**: e31682116.
69. Sanford J.C., Johnston S.A.: The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology*, 1985, **113**: 395-405.
70. Scholthof K.B.G., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G.D.: Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 2011, **12(9)**: 938-954.
71. Sequeira L.: Cross protection and induced resistance: their potential for plant disease control. *Trends Biotechnol.*, 1984, p. 25-29.
72. Sierron N., Battey J.N.D., Ouadi S., Bakaher N., Bovet L., Willing A., Geopfert S., Peitsch M.C., Ivanov N.V.: The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nature Communications*, 2014, p. 1-9.
73. Siwert R.C.: Sources of resistance to potato virus Y in the genus *Nicotiana*. *Tobacco Science*, 1972, **106**: 92-94.
74. Sońdka Z., Tretryn A., Szeliga J., Jackowski M.: Udział białek zawierających powtórzenia bogate w leucynę (LRR) w molekularnych mechanizmach odporności wrodzonej roślin i zwierząt. *Postępy Biologii Komórki*, 2006, **33(4)**: 635-655.
75. Stam M., Mol., Kooter J.M.: Review article: The silence of genes in transgenic plants. *Annals of Botany*, 1997, **79**: 3-12.
76. Stehmann J.R., Semir J., Ippolito A.: *Nicotiana mutabilis (Solanaceae)*, a new species from southern Brazil. *Kew Bull.* 2002, **57**: 639-646.
77. Sudarsono Young J.B., Woloshuk S.L., Parry D.C., Hellmann G.M., Wernsman E.A., Lommel S.A., Weissinger A.K.: Transgenic Burley and flue-cured tobacco with resistance to four necrotic isolates of potato virus Y. *Phytopathology*, 1995, **85**: 1493-1499.
78. Szalata M., Słomski R., Twardowski T.: 11. Perspektywy rozwoju nowoczesnej biotechnologii. *Biotechnologia 2020. O co najczęściej pytamy*. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu; Poznań: Polska Akademia Nauk, Oddział w Poznaniu, 2020, **11**: 230-240
79. Tezuka T., Kuboyama T., Matsuda T., Marubashi W.: Seven of eight species in *Nicotiana section Suaveolentes* have common factors leading to hybrid lethality in crosses with *Nicotiana tabacum*. *Annals of Botany*, 2010, **106**: 267-276, doi: 10.1093/aob/mcq114.
80. Thole V., Dalmay T., Burgyán J., Balázs E.: Cloning and sequencing of potato virus Y (Hungarian isolate) genomic RNA. *Gene*, 1993, **123**: 149-156, doi: 10.1016/0378-1119(93)90118-M.
81. van Schie C.C.N., Takken F.L.W.: Susceptibility genes 101: How to be a good host. *Annual Review of Phytopathology*, 2014, **52**: 551-581.
82. Verrier J.L., Marchand V., Cailleteau B., Delon R.: Chemical change and cigarette smoke mutagenicity increase associated with CMV-DTL and PVY-N infection in burley Tobacco. *Inf. Bull. CORESTA*, Cape Town, 2001, p. 1.
83. Verrier J.L., Doroszevska T.: Tobacco Virus Collaborative Study (1996–2011). *Virus Disease Sub-Group. Technical Report. CORESTA*, 2018: <https://www.coresta.org/tobacco-virus-collaborative-study-1996-2011-31554.html>.
84. Verrier J.L., Doroszevska T.: The PVY collaborative experiment 1996–2002: a global synthesis of results, Report of the Agronomy and Phytopathology Group of CORESTA (Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco; ), 2002, available on website: <http://www.imperialtobaccoscience.com>
85. Wen C., Wu Y., Li H., Wang H., Liu Q.: Influences on photosynthesis and respiration of tobacco infected by Potato Virus Y – vein necrosis strain. *Bull. Inf. CORESTA*, Suzhou, China, 1999, p. 10-11.
86. Wernsman E.A.: Varied roles for the haploid sporophyte in plant improvement. In: *Plant breeding in the 1990s*, H.T. Stalker and J.P. Murphy (eds). *Proc. Symp. Plant Breeding in the 1990s*, Raleigh, NC. March 1991. CABI Publ., Wallingford, UK, 1992, pp. 461-484.



87. Wittmann S., Chatel H., Fortin M.G., Laliberte J.F.: Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology*, 1997, **234**: 84-92.
88. Wu Y., Liu Q., Zheng Y., Sun S.: Technics of breeding a new transgenic tobacco line and a G28 mutant resistant to potato virus Y – vein necrosis strain. *Inf. Bull. CORESTA*, Suzhou, China, 1999, p. 13-14.
89. Yamamoto Y.: Studies on breeding of tobacco varieties resistant to veinal necrosis disease by potato Y strain. *T. Bull. Leaf Tobacco Research Laboratory*, 1992, **2**: 1-85.
- 

Adres do korespondencji:

*mgr Anna Depta*  
*Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin*  
*IUNG-PIB*  
*ul. Czartoryskich 8*  
*24-100 Puławy*  
*tel. 81 4786 935*  
*e-mail: Anna.Depta@iung.pulawy.pl*

---

AUTOR	ORCID
Anna Depta	0000-0001-7578-5197

**Marcin Przybyś**

*Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy  
w Puławach*

## WIRUS MOZAIKI OGÓRKA (CMV) I WIRUS BRĄZOWEJ PLAMISTOŚCI POMIDORA (TSWV) – WYSTĘPOWANIE, BUDOWA I KLASYFIKACJA\*

**Słowa kluczowe:** wirus, CMV, TSWV, tytoń

### Wstęp

Co roku nawet 40% światowych plonów jest niszczone przez różne agrofagi. Straty ekonomiczne powodowane przez wirusy roślinne szacuje się na miliardy dolarów. Wirusy mozaiki ogórka oraz brązowej plamistości pomidora są powszechnie występującymi patogenami na świecie mogącymi zakażać ponad 1000 gatunków roślin należących do kilkudziesięciu rodzin. Walka z tymi patogenami nie jest możliwa bez wnikliwego poznania ich biologii. W poniższym artykule przedstawiono budowę, klasyfikację, sposoby transmisji wirusów oraz możliwości zapobiegania infekcjom.

### Wirus mozaiki ogórka (CMV)

Wirus mozaiki ogórka (CMV, ang. *Cucumber mosaic virus*) jest odpowiedzialny za istotne straty agronomiczne w wielu uprawach na całym świecie. Wirus ma prawdopodobnie największą liczbę żywicieli wśród wirusów roślinnych i wykazuje wysoki stopień różnorodności, o czym świadczy duża liczba izolatów różniących się zarówno pod względem biologicznym, jak i molekularnym. W 1991 r. Edwanson i Christie (45) donieśli o 1241 gatunkach żywicieli w 101 rodzinach roślin, w tym jednoliściennych i dwuliściennych. Wirus mozaiki ogórka to gatunek należący do rodzaju *Cucumovirus* i rodziny *Bromoviridae*. U większości zakażonych gospodarzy, w zależności od jego genotypu i szczepu wirusa, pojawiają się objawy mozaikowe, mniej lub bardziej nasilone. U tytoniu wywołuje deformacje liści i objawy mozaiko-

\*Opracowanie wykonano w ramach zadania 7.1 pt. „Opracowanie i aktualizacja Programów integrowanej ochrony roślin uprawnych w zakresie tytoniu i chmielu” z dotacji budżetowej przeznaczonej na realizację zadań MRiRW w 2022 r.

we. Bardziej zjadliwe izolaty powodują miejscowe nekrozy lub nekrozy systemiczne, a niekiedy jasnożółte przebarwienia blaszki liściowej wzdłuż nerwów przypominające kształtem liść dębu. W indukcję jasnożółtej chlorozy tytoniu zaangażowane jest satelitarne RNA (satRNA) wirusa CMV (150, 155). Satelitarne RNA posiada 22-nukleotydową sekwencję komplementarną do mRNA jednostki I chelatazy protoforfiryny tytoniu (ChII), genu niezbędnego w syntezie chlorofilu. Badania wykazały, że chloroza tytoniu rozwijała się wskutek zmniejszenia ekspresji genu ChII powodowanego wyciszaniem RNA. Ciężkie objawy zakażenia wirusem mozaiki ogórka na tytoniu powodujące systemiczną nekrozę obserwowano w Stanach Zjednoczonych w latach pięćdziesiątych XX wieku (43, 53).

Istnieje wiele izolatów CMV o zróżnicowanych właściwościach biologicznych. Tradycyjna klasyfikacja szczepów wirusa CMV opierała się na patotypach i objawach morfologicznych u różnych gatunków żywicieli (78). Na przykład sześć izolatów CMV zidentyfikowano na podstawie zaobserwowanych odmiennych objawów na roślinach żywicielskich (54). Yasuo (183) na podstawie wywoływanych objawów sklasyfikował szczepy CMV w tytoniu na pięć grup, wykorzystując 10 różnych gatunków żywicieli (101). Hollings i in. (69) zidentyfikowali izolaty CMV z Wielkiej Brytanii według roślin wskaźnikowych jako podgrupy PY/Y i II. Jednak współczesna klasyfikacja szczepów wirusa mozaiki ogórka została stworzona na podstawie serologii (71, 72), hybrydyzacji kwasów nukleinowych (122), sekwencji genów (121, 161) oraz polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (135, 50). Na podstawie sekwencji nukleotydowej nieulegającego translacji regionu 5' (UTR) genomowego RNA3 pochodzące z całego świata izolaty wirusa CMV podzielono na trzy podgrupy: IA, IB i II (138). Podobieństwa sekwencji nukleotydowej między różnymi podgrupami wynoszą: 92%–94% (IA/IB), 74%–78% (IA/II) i 73%–78% (IB/II) (137, 139). Szczepy wirusa CMV sklasyfikowane jako IA i II występują na całym świecie, podczas gdy występowanie szczepów należących do podgrupy IB jest ograniczone głównie do wschodniej Azji (136). Wysoka różnorodność genetyczna szczepów CMV ma wpływ na różnice w ich właściwościach biologicznych. Ta różnorodność umożliwiła poznanie wpływu roli genów wirusa na zjadliwość poszczególnych izolatów CMV. Ogólnie szczepy z podgrupy I są bardziej zjadliwe niż szczepy z podgrupy II. Większość szczepów z podgrupy I powoduje silne objawy, w tym mozaikę, karłowatość i nekrozy, podczas gdy większość szczepów z podgrupy II powoduje bardzo łagodne objawy lub infekcję bezobjawową. Ponadto tolerancja izolatów wirusa na wysoką temperaturę jest większa w podgrupie I niż w podgrupie II (100). Do niedawna typowanie izolatów opierało się zasadniczo na sekwencji genu kapsydu (CP, ang. *Capsid Protein*). Jednak głębsza analiza pełnych sekwencji nukleotydowych wirusa wykazała, że drzewa filogenetyczne zbudowane na podstawie sekwencji innych białek tylko częściowo potwierdzały grupowanie zaproponowane wcześniej dla CP (IA, IB, II). Sugeruje to, że rekombinacja lub przynajmniej reasortacja mogła odgrywać ważną rolę w ewolucji CMV (136). Wirusy RNA przechodzą szybkie zmiany genetyczne poprzez mutacje, rekombinacje

lub w przypadku wirusów, których genom składa się z kilku cząsteczek RNA – reasortację (137). Podczas procesu rekombinacji donor zastępuje wysoce homologiczny region w akceptorze, co pozwala rekombinantowi zachować pierwotną organizację genomową macierzystej cząsteczki RNA (91). Chociaż znaczenie rekombinacji było niedoceniane we wczesnych badaniach ewolucji genomu wirusa, obecnie jest ona uznawana za szeroko rozpowszechnioną wśród wirusów o dodatniej (+) polarności nici RNA: u zwierząt (70, 178) i roślin (22, 171), a także w retrowirusach, takich jak ludzki wirus HIV typu I (55). Rekombinacja jest rzadkim lub nawet nieistniejącym zjawiskiem wśród wirusów o ujemnej polarności (-) nici RNA (23). Sekwencjonowanie i charakterystyka molekularna pełnych genomów wirusów RNA sugerują, że wiele naturalnych szczepów powstało w wyniku rekombinacji genetycznej między pokrewnymi lub niespokrewnionymi wirusami (91). Rekombinacja może być dominującą siłą w kształtowaniu architektury genetycznej organizmów i związanych z nimi fenotypów (128). Dlatego rekombinacja RNA jest coraz częściej uznawana za znaczące i powszechne zjawisko w biologii wirusów RNA (104). Generowanie zarówno rekombinantów, jak i reasortantów jest ograniczone występowaniem infekcji mieszanych. Dane dotyczące innych wirusów roślinnych pokazują, że rekombinanty są częstsze niż reasortanty (56, 57). Selekcja naturalna działa przeciwko reasortantom z uwagi na istnienie koadaptacji segmentów genomu (57).

Wiriony wirusa mozaiki ogórka są ikozaedrycznymi cząstkami o średnicy 28–30 nm i składają się ze 180 podjednostek pojedynczego białka kapsydu (CP) ułożonych w klastry pentamer-heksamer (108). Wiriony zawierają 18% RNA. Genom składa się z trzech jednoniciowych RNA o dodatniej polarności, nazwanych RNA1, RNA2 i RNA3 oraz subgenomowych RNA4 i RNA4A (154). Są one pakowane w oddzielne cząstki podobnie jak u innych wirusów roślinnych z podzielonymi genomami. Pozwala to na upakowanie większego genomu w bardzo prosty wirion, ale wymaga, aby wiele cząstek wirusa zaatakowało pojedynczą komórkę, aby zainicjować infekcję (136). CMV zawiera pięć otwartych ramek odczytu (ORF). Białka 1a (111 kDa), 2a (97 kDa) i 3a (30 kDa) ulegają translacji odpowiednio z genomowych RNA 1, 2 i 3, a białka 2b (15 kDa) i 3b (25 kDa) – odpowiednio z subgenomowych RNA 4A i RNA 4 (108).

RNA1 jest monocistronowy i koduje białko 1a, które posiada domenę metylotransferazy w części N-końcowej i motyw helikazy w części C-końcowej (188). Białko 1a jest składnikiem kompleksu replikazy wirusa (68). RNA2 koduje duże białko 2a, które posiada motyw GDD (Gly-Asp-Asp) typowy dla zależnej od RNA polimerazy RNA (RdRp) oraz małe białko 2b, które ulega ekspresji z otwartej ramki odczytu ORF 2b nakładającej się na 3'-końcową część ORF 2a (42). Białko 2a razem z białkiem 1a, wewnętrznymi białkami tonoplastu roślin i innymi niezidentyfikowanymi białkami gospodarza, tworzy replikazę wirusa (68, 84, 116). Bicistronowy RNA3 koduje białko 3a nazywane również białkiem MP (ang. *Movement Protein*) oraz białko kapsydu (CP). Chociaż pierwsza ORF każdego bicistronowego RNA jest wyrażana z genomowego RNA, druga ORF jest kodowana przez subgenomowe RNA4A (białko 2b) i RNA4

(CP). Całkowita długość każdego RNA może się nieznacznie różnić w zależności od szczepu, ale każda ORF różnych szczepów ma podobną wielkość, z wyjątkiem ORF 2a i ORF 2b – wirusów z podgrupy II, które są mniejsze niż ich odpowiedniki w podgrupie I (184). Każdy RNA ma strukturę czapeczki na swoim 5'-końcu i może przyjąć strukturę podobną do tRNA na 3'-hydroksylovanym końcu. Ponadto ok. 150 nukleotydów na 3'-końcach jest wysoce konserwatywnych wśród różnych szczepów.

U wirusa mozaiki ogórka mogą występować małe RNA (sRNA), wśród których wyróżnia się RNA5 i satelitarne RNA (satRNA). Mogą być one enkapsydowane podobnie do cząsteczek RNA1, RNA2 i RNA3. RNA5 występuje w izolatach CMV należących do podgrupy II, liczy około 300 nukleotydów długości i składa się z mieszaniny 3'-końców RNA2 i RNA3. W przeciwieństwie do genomowych i subgenomowych RNA, RNA5 nie ma czapeczki i nie zaobserwowano żadnych polipeptydów związanych z jego obecnością. Około dwudziestu nukleotydów zlokalizowanych na 5'-końcu RNA5, tworzących Box-1, jest wysoce konserwatywnych między CMV podgrupy II i – również należącym do rodzaju *Cucumovirus* – wirusem aspermy pomidora (TAV, ang. *Tomato aspermy virus*) (163). Ponadto zidentyfikowano cztery struktury typu stem-loop otaczające Box-1 u CMV. Mutacje w tych strukturach lub usunięcie Box-1 wpłynęły na wytwarzanie RNA5, ale nie miały wpływu na akumulację wirusa lub rozwój objawów chorobowych (163). De Wispelaere i Rao (38) wykazali ponadto, że produkcja RNA5 jest niezależna od namnażania wirusa. Box-1 nie występuje w podgrupie I CMV (163).

Satelitarne RNA występujące u wirusa mozaiki ogórka to małe, niekodujące RNA, które wykazują nieznaczne podobieństwo sekwencji do genomu wirusa, ale są w pełni zależne od białek kodowanych przez genom CMV w zakresie replikacji i enkapsydacji. Szczególną uwagę zwrócono na satelitarne RNA na początku lat osiemdziesiątych, kiedy wykazano, że nawet jeśli niektóre satelitarne RNA były odpowiedzialne za rozwój choroby na pomidorach, prawie wszystkie powodowały znaczny spadek akumulacji wirusa i nasilenia objawów u wszystkich innych badanych żywicieli, działając jak pasożyt wirusa. Po spowodowaniu szczególnie poważnych szkód w uprawach pomidorów w Hiszpanii, we Francji i Włoszech w latach osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych XX wieku, satelitarny RNA nie był wykrywany w innych epidemiach powodowanych przez CMV. Jego pochodzenie pozostaje niejasne, chociaż wykazano, że satelitarne RNA może pojawić się po kolejnych pasażach izolatów wolnych od satelitarnego RNA u niektórych gospodarzy, zwłaszcza tytoniu (74), a nawet z inokulum pochodzącym z cDNA (63).

Pierwszy etap replikacji wirusa obejmuje syntezę nici RNA o ujemnej (–) polaryzacji, która jest wykorzystywana do produkcji nici o polaryzacji dodatniej (+). Nici (+) spełniają trzy funkcje, tj.: stanowią mRNA do translacji, są matrycą do dalszej transkrypcji oraz mogą być wykorzystane do wytwarzania wirionów. Replikacja wirusowych cząsteczek RNA jest asymetryczna. Uważa się, że asymetria replikacji jest powszechna dla wirusów o dodatniej nici RNA. W przypadku CMV akumulacja

(-) nici osiąga plateau wkrótce po zakażeniu, podczas gdy akumulacja nici (+) nadal wzrasta i może osiągnąć poziom prawie 100-krotnie wyższy niż w przypadku nici (-) (147). Wykazano, że podczas gdy oba białka 1a i 2a są wymagane do syntezy nici (-), samo białko 2a może wytwarzać nici (+) z (-) matrycy genomowego lub subgenomowego RNA (147). Możliwość ta może tłumaczyć nie tylko obecność wolnego białka 2a w cytoplazmie, ale także wyższy udział nici (+) w zakażonych komórkach. Również fosforylacja białka 2a, zapobiegając jego połączeniu z białkiem 1a, może indukować przejście z syntezy nici (-) na (+) lub, alternatywnie, przejście od transkrypcji do translacji nici (+) (85). Jednocześnie enkapsydacja powoduje sekwestrację nici (+), a tym samym zapobiega transkrypcji lub translacji. Białko 2a wpływa również na zjadliwość wirusa. Wiele izolatów CMV indukuje miejscowe zmiany nekrotyczne, w których wirus jest ograniczany przez reakcję typu nadwrażliwości, jednak istnieją również izolaty zdolne do infekcji systemowej. Kim i Palukaitis (85, 86) ustalili, że dwa aminokwasy w pozycjach 631F i 641A białka 2a są odpowiedzialne za wywołanie miejscowych zmian nekrotycznych. Co ciekawe, podstawienie 631F → Y w białku 2a indukowało nekrozy systemiczne u wspięgi wężowatej (*Vigna unguiculata*). Również Divéki i in. (43), wykorzystując izolat Ns wirusa mozaiki ogórka, stwierdzili jego zdolność do wywoływania nekroz systemicznych u *N. clevelandii*, *N. glutinosa* i *N. tabacum* cv. Xanti. Wykazali oni, że aminokwas 461C w białku 1a jest czynnikiem determinującym śmierć komórki, podczas gdy jego substytucja na 461R nie powodowała takiej reakcji.

Białko 2b wpływa na przemieszczanie się wirusa oraz hamuje mechanizmy obronne gospodarza oparte na odporności indukowanej kwasem salicylowym (SA), kwasem jasmonowym (JA) i wyciszeniu RNA (60, 72, 75, 98, 156). Białko 2b jest ważnym wyznacznikiem wirulencji CMV. Podobieństwo sekwencji aminokwasowej białka 2b pomiędzy szczepami z podgrupy I i bezobjawowej podgrupy II wynosi 53%–54% (42), a białko 2b podgrupy I jest o 10 aminokwasów dłuższe niż białko 2b z podgrupy II (42). Uważa się, że różnica w zjadliwości między podgrupami I i II jest wynikiem różnic w genie 2b (149). Nasilenie objawów wywołanych przez szczepy CMV podgrup IA, IB i II jest w dużej mierze determinowane przez właściwości właśnie tego białka (44, 148), czego potwierdzeniem był łagodny mutant szczepu Q należący do podgrupy II CMV, który nie miał zdolności wytwarzania prawidłowego białka 2b, przez co nie był w stanie poruszać się ogólnoustrojowo w ogórku i wykazywał zmniejszoną indukcję objawów w roślinach *Nicotiana glutinosa* i *N. tabacum* (41, 75). Z kolei inny mutant 2b należący do podgrupy IA szczepu Fny (Fny-CMVΔ2b) przemieszczał się ogólnoustrojowo w *N. tabacum* i *N. benthamiana*, ale nie wywoływał objawów (156, 187). Konstytutywna ekspresja genów 2b z różnych szczepów CMV podgrupy II i podgrupy IA w transgenicznym roślinach *Nicotiana* spp. potwierdziła, że nasilenie objawów wywołanych przez te szczepy było związane ze zdolnością ich białek 2b do zakłócania regulacji ekspresji genów gospodarza przez (mi)RNA (20, 99, 186). Rośliny transgeniczne z ekspresją białka Fny-CMV 2b wykazywały objawy silnego

zniekształcenia liści, ogólne zahamowanie wzrostu i zaburzenia architektury korzeni (99), podczas gdy rośliny transgeniczne z ekspresją białka 2b z mutanta Q miały podobny wygląd do roślin nietransgenicznych (20, 99, 152, 186).

Przemieszczanie się wirusa na małe odległości do sąsiednich komórek odbywa się przez plasmodesmy. Choć wszystkie białka wirusowe mogą być zaangażowane w ten ruch, białko 3a (MP, ang. *Movement Protein*) kodowane przez RNA3 jest uważane za odpowiedzialne za przemieszczanie się wirusa. Białko MP posiada zdolność zwiększania SEL plazmodesm (ang. *Size Exclusion Limit*) poprzez zrywanie filamentów F-aktyny (159). SEL stanowi największą możliwą masę cząsteczki, która może przemieszczać się przez plazmodesmę na zasadzie dyfuzji (179). Wirusy w przemieszczaniu się na duże odległości wykorzystują floem i wędrują razem z asymilatami roślinnymi (111). Cząstki wirusa CMV migrują do poszczególnych organów przez rurki sitowe (129). Badania różnych kombinacji szczepów CMV i gatunków gospodarzy pokazują, że wszystkie białka wirusowe mogą mieć wpływ na przemieszczanie się wirusa na duże odległości, jednak to białka CP, MP i 2b odgrywają tu decydującą rolę. Szczególnie końcowy region białka MP odpowiada za infekcję systemiczną. Warianty wirusa pozbawione 33 aminokwasów na C-końcu białka MP nie były zdolne do wywołania zakażenia systemicznego roślin tytoniu (84). Ponadto białko 2b warunkuje migrację na duże odległości w sposób zależny od gospodarza. Usunięcie genu 2b zapobiegało infekcji ogólnoustrojowej ogórka, kabaczka, papryki i pomidora, ale nie miało wpływu w przypadku niektórych gatunków z rodzaju *Nicotiana* (41, 98, 156).

Białko kapsydu (CP) jest jedynym białkiem związanym z cząsteczkami wirusa i jedynym wyznacznikiem przenoszenia przez wektory mszyc. Niewielkie zmiany w sekwencji białka otoczki wirusa mogą wpływać na zdolność szczepów CMV do przenoszenia przez mszyce (123). Co więcej, według Mochizuki i Ohki (109) pewne pozycje aminokwasowe w białku CP pełnią ważne funkcje, w szczególności aminokwas w pozycji 129, w której mutacja wpływa na objawy wywoływane u gospodarza i wydajność przenoszenia wirusa.

W środowisku naturalnym wirus mozaiki ogórka jest przenoszony zarówno przez mszyce w sposób nietrwały, jak również przez nasiona niektórych gatunków żywicieli (13). Obecnie powszechnie uważa się, że przenoszenie wirusów przez mszyce przebiega w dwóch głównych trybach różniących się tym, czy wirusy w organizmie wektora ulegają replikacji czy nie (115). Transmisja wirusa CMV odbywa się w sposób nietrwały i odpowiada trybowi bez replikacji. Charakteryzuje się krótkim czasem pobierania i inokulacji (od sekund do minut) bez zatrzymywania się w ciele owada. Mszyce pozostają zakażone przez krótkie okresy i tracą zdolność przenoszenia wirusa chwilę po żerowaniu. Wirus CMV jest przenoszony przez ponad 85 gatunków mszyc (45). Gildow i in. (62) spośród 25 gatunków mszyc zebranych na kilku polach zidentyfikowali sześć z nich jako główne czynniki przyczyniające się do rozprzestrzeniania wirusa CMV w warunkach naturalnych: *Rhopalosiphum*

*maidis*, *Aphis gossypii*, *Therioaphis trifolii*, *A. fabae*, *A. glycines* i *Acyrtosiphon pisum*. Spośród nich wskazano cztery gatunki będące najbardziej wydajnymi wektorami: *A. gossypii*, *A. glycines*, *A. pisum* i *T. trifolii* (62). Badania wykazały, że nie ma związku między wydajnością transmisji a akumulacją wirusa w roślinie źródłowej, w przypadku gdy ta akumulacja wirusa jest powyżej pewnego poziomu (5). Poniżej tego poziomu wydajność transmisji zależy od akumulacji wirusa w roślinie źródłowej (10). Jak wspomniano wcześniej, satelitarne RNA drastycznie zmniejsza replikację genomu wirusa, szczególnie u gospodarzy psiankowatych (47). W takim przypadku populacja wektorów będzie determinować powodzenie epidemii wirusa. Opracowano nawet modele w celu wyjaśnienia tego zjawiska w uprawach pomidora (47). Pomidory zakażone CMV mogą rozwinąć objawy mozaikowe (izolaty wolne od satRNA), łagodne objawy (izolaty zawierające nienekrotyczny satRNA) lub nekrozy (izolaty zawierające nekrotyczny satRNA). Satelitarne RNA są mało rozpowszechnione w naturalnych izolatach. Chociaż izolat wolny od satRNA może być przenoszony ze źródła zawierającego nienekrotyczny satRNA, nigdy nie zaobserwowano tego w przypadku izolatów nekrotycznych (47). Najbardziej wydajnie przenoszone przez mszyce były izolaty wolne od satRNA, potem izolaty zawierające nienekrotyczne satRNA, a najmniej wydajnie – izolaty nekrotyczne (47).

Transmisja wirusa mozaiki ogórka jest możliwa również przez nasiona roślin uprawnych lub dzikich gatunków. Rośliny wyhodowane z zakażonych nasion stanowią główne źródło wirusa w uprawach, z których wirus może być skutecznie rozprzestrzeniany przez mszyce (123). Badanie nieskiełkowanych nasion na obecność wirusa jest istotne z punktu widzenia fitopatologicznego, ale może prowadzić do przeszacowania miana wirusa z powodu zanieczyszczenia tym patogenem okrywy nasiennej. Rzeczywiste przenoszenie CMV przez nasiona, czyli przez zarodek, zostało potwierdzone u fasoli, szpinaku (181), soczewicy (103), łubinu (119) oraz pieprzu (4). Wykrywanie wirusa w partiach nasion lub w roślinach z wykiełkowanych nasion zostało również udokumentowane u wspięgi wężowatej i fasoli złotej (7, 19), grochu, bobiku, ciecierzycy, wyki, konicyzny (94), pomidora (125), lucerny (76), grochu (117) i dyni (163). Wskaźniki przenoszenia są na ogół dość niskie – poniżej 2,5%, chociaż wystarczające do skutecznego wywołania epidemii. Wyższe wskaźniki obserwowano w przypadku soczewicy – do 9,5%, pomidora – 8%, szpinaku – 15% i wspięgi – 21%.

Istotnym zagadnieniem dotyczącym epidemii CMV jest rola żywicieli rezerwuarowych, którzy umożliwiają wirusowi przetrwanie między kolejnymi uprawami. CMV został opisany w wielu dzikich i zachwaszczonych roślinach występujących w środowisku naturalnym, gdzie wywołuje utajoną infekcję, ponieważ rośliny nie rozwijają żadnych widocznych objawów. Uważa się, że rośliny te stanowią główne zewnętrzne źródło infekcji dla roślin uprawnych i umożliwiają przetrwanie wirusa pomiędzy sezonami i następującymi po sobie uprawami, tym bardziej, że niektóre z nich mogą przenosić CMV przez nasiona. Chwasty stanowią również rezerwuar mszyc. Z tych powodów odchwaszczanie pól uprawnych jest jednym z kluczowych



elementów zintegrowanego zarządzania chorobami wirusowymi dla upraw ważnych ekonomicznie (77, 95).

W przypadku chorób wirusowych bardzo trudno opracować skuteczne metody zapobiegania infekcjom. Dotychczas wdrożono jednak kilka strategii polegających na zwalczaniu chwastów będących rezerwuarem wirusa, usuwaniu z plantacji zakażonych roślin i stosowanie nasion wolnych od patogenów. W celu zwalczania wektora – mszyc, stosowane są pestycydy chemiczne jak i biologiczne, tj.: pyretroidy, karbaminy oraz abamektyna pozyskiwana z bakterii glebowej *Streptomyces avermitilis* (100). Szeroki zakres żywicieli i duża liczba wektorów owadzi sprawiają jednak, że zwalczanie choroby jest bardzo trudne (123). Ponadto chemiczne insektycydy są uważane za nieekonomiczne i nieprzyjazne dla środowiska. W Japonii w uprawie ogórków stosowany jest profilaktycznie szczep CM95 wirusa CMV w celu wywołania łagodnych objawów. Wykorzystywana jest w ten sposób ochrona krzyżowa przed zakażeniem upraw przez bardziej zjadliwe izolaty (90). Prowadzone są również prace nad wykorzystaniem bakterii *Bacillus velezensis*, znanej z silnego działania przeciwgrzybiczego, w trzech kierunkach ochrony przeciwwirusowej: zapobieganiu zakażeniom, ograniczaniu objawów po zakażeniu oraz inaktywacji wirionów CMV przed zakażeniem (2). Badania prowadzono na roślinach bielunia dziędzierzawy (*Datura stramonium*). Najciekawsze wyniki osiągnięto w teście inaktywacji wirionów. W tym celu mieszano takie same objętości oczyszczonego CMV i zawiesiny komórkowej *Bacillus velezensis*, inkubowano przez 1 godzinę i zakażano rośliny testowe. W efekcie doświadczenia stwierdzono 97% odsetek roślin bez objawów. Bardzo dobry efekt osiągnięto również w kierunku zapobiegania zakażeniom przez profilaktyczny oprysk filtrem komórek bakterii. Ponadto taki oprysk indukował odporność ogólnoustrojową powodującą podwyższony poziom transkrypcji genów PAL, CHS, HQT, PR-1 i POD w liściach *D. stramonium*. Stwierdzono również, że pirolo-[1,2-a]-pirazyno-1,4-dion produkowany przez *B. velezensis* jest głównym związkami, który może działać jako cząsteczka elicytorowa indukująca odporność układową roślin i hamująca zarówno wzrost grzybów, jak i replikację wirusa. W konsekwencji *B. velezensis* można uznać za potencjalne źródło produkcji związków bioaktywnych do zwalczania chorób roślin. W innych badaniach zastosowanie u *Nicotiana benthamiana* oprysku zawiesiną *Bacillus amyloliquefaciens* powodowało zmniejszenie nasilenia objawów CMV i ograniczało akumulację wirusa w opryskiwanych liściach (96). Jednakże najskuteczniejszą, zrównoważoną i długotrwałą strategią zwalczania CMV jest hodowla odmian odpornych na choroby (182), chociaż konwencjonalne czynniki odporności mogą być niewystarczające lub zapewniać nieefektywną bądź krótkotrwałą ochronę (56).

### **Wirus brązowej plamistości pomidora (TSWV)**

Wirus brązowej plamistości pomidora (TSWV, ang. *Tomato spotted wilt virus*) należy do rodzaju *Tospovirus*, rodziny *Bunyaviridae* (3, 87). *Bunyaviridae* to jedna

z największych rodzin wirusów RNA, do której należą wirusy ludzkie, zwierzęce i roślinne (46), posiadające trzysegmentowy genom. Rodzinę reprezentuje pięć odrębnych rodzajów: *Bunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus*, *Hantavirus* i *Tospovirus* (127). TSWV ma bardzo szeroki zakres żywicieli – zaraża ponad 1000 gatunków roślin w 80 rodzinach i jest przenoszony przez wciornastki w sposób trwały (59, 124). Straty upraw spowodowane tym wirusem oszacowano na ponad 1 miliard dolarów rocznie (124). TSWV powoduje znaczne straty plonów w wielu uprawach rolniczych i ogrodniczych, takich jak: fasola, sałata, orzeszki ziemne, papryka, ziemniak, tytoń i pomidor (120, 124). TSWV może zarażać na wszystkich etapach wzrostu rośliny, od wysadzenia do dojrzałości. Jednak w przypadku tytoniu, młodsze – aktywnie rosnące rośliny wydają się być bardziej podatne na infekcję niż starsze (145). Objawy na tytoniu mogą mieć charakter pojedynczych, jasnych bądź żółtawych plam, ale mogą się też rozwinąć do symptomów ogólnoustrojowych i nekroz. Pojedyncze objawy świadczą o infekcji lokalnej. Infekcja z czasem staje się ogólnoustrojowa, kiedy z miejsca zakażenia zostanie przeniesiona do systemu korzeniowego, gdzie wirus podlega replikacji (25). Infekcja ogólnoustrojowa często występuje, gdy czynniki środowiskowe, takie jak temperatura, nawadnianie lub opady deszczu, powodują nagły wzrost rośliny. Infekcja ogólnoustrojowa prowadzi do nekroz liści i pąków wierzchołkowych. Często wywołuje objawy widoczne na połowie powierzchni liścia oraz powoduje zagięcie wierzchołka łodygi, co wskazuje, że wirus może się przemieszczać w ksylemie (25).

Analiza porównawcza pełnych sekwencji genomu kilku izolatów TSWV, w tym brazylijskiego TSWV BR-01 pozyskanego z *Nicotiana rustica*, TSWV-YN z *Chenopodium quinoa*, TSWV-KP z *Capsicum annuum*, TSWV-1, TSWV-2 i TSWV-3 z pomidora i papryki oraz trzech hiszpańskich izolatów: LL-N.05 (typ dziki), Pujoll TL3 (przełamujący odporność warunkowaną genem Sw-5) i PVR (przełamujący odporność warunkowaną genem Tsw), wykazała ponad 90% identyczności sekwencji nukleotydów, co wskazuje na stosunkowo konserwatywny genom tego wirusa (29, 30, 35, 66, 83, 89). Na podstawie szczegółowej wiedzy o brazylijskim izolacie BR-01 pochodzącym z *Nicotiana rustica*, TSWV został sklasyfikowany jako jedyny członek rodzaju *Tospovirus* w rodzinie *Bunyaviridae* (51, 52).

Historycznie de Ávila i in. (32, 33, 34) wykazali, że 21 izolatów pochodzących z różnych obszarów geograficznych i upraw można podzielić na trzy odrębne serogrupy przy użyciu przeciwciał poliklonalnych skierowanych przeciwko białku N kodowanemu przez tego wirusa. Większość badanych izolatów należało do serogrupy I, w tym izolat typu BR-01. Izolaty serogrupy I słabo reagowały z przeciwciałami przeciwko wirusom serogrupy II i nie reagowały z przeciwciałami wytworzonymi przeciwko wirusom serogrupy III. Ponadto serogrupa II została podzielona na dwa odrębne serotypy (34). Serogrupa III składała się z niemal identycznych izolatów z roślin niecierpka pochodzących z USA (93) oraz Holandii (28, 32), różniących się serologicznie całkowicie od wirusów serogrup I i II (32, 33, 92, 93).

Aby ustalić kryteria definiowania różnych tospowirusów jako gatunku, określono i porównano sekwencje nukleotydowe genów N i skład aminokwasowy produktów z siedmiu izolatów wstępnie sklasyfikowanych w trzech serogrupach (32). Określono sekwencje nukleotydowe genów nukleoproteiny (N) siedmiu izolatów tospowirusów reprezentujących trzy serogrupy i zastosowano je do ustalenia parametrów filogenetycznych w celu określenia gatunków w obrębie rodziny *Bunyaviridae*. Wysoką rozbieżność sekwencji (55,9% identyczności na poziomie nukleotydów) zaobserwowano między izolatami serogrupy I i izolatami serogrupy III. Izolaty serogrupy II zajmowały pozycję pośrednią. Ich geny N wykazują 75% identyczności z genami izolatów serogrupy I i 57% z genami izolatów serogrupy III. Podczas gdy izolaty w obrębie serogrup I lub III mają prawie identyczne sekwencje, dwa izolaty BR-03 i SA-05 z serogrupy II znacznie różniły się od siebie (82,1% identyczności sekwencji). Na podstawie sekwencji nukleotydowej genów N izolaty należące do serogrupy I sklasyfikowano jako wirus TSWV, izolaty należące do serogrupy III jako wirus nekrotycznej plamistości niecierpka (INSV, ang. *Impatiens necrotic spot virus*), a w obrębie serogrupy II wyodrębniono dwa dodatkowe gatunki: wirus chlorotycznej plamistości pomidora (TCSV, ang. *Tomato chlorotic spot virus*) i pierścieniową plamistość orzeszków ziemnych (GCSV, ang. *Groundnut chlorotic spot virus*) (32).

Wiriony TSWV mają kulisty kształt i średnicę 80–120 nm. Zewnętrzna błona składa się z lipoprotein zawierających dwie glikoproteiny – GN i GC, które odgrywają kluczową rolę w tworzeniu cząstek wirusa, dojrzewaniu i uwalnianiu w organizmie gospodarza (114). Na powierzchni otoczki wirusa występują w postaci kolców (132). Niedawno przewidziano trójwymiarowe struktury tych dwóch białek, które wykazały, że koniec karboksylowy GN jest niezbędny do heterodimeryzacji z GC. Co więcej, badanie dokowania białko-ligand przewidziało tunikamycynę i dystamycynę-A jako najskuteczniejsze substancje działające przeciwwirusowo w stosunku do TSWV (157).

Genom TSWV składa się z rybonukleoprotein niosących trzy różne RNA: nić genomowego RNA o ujemnej polaryzacji i długości około 8,9 kb (RNA L) oraz dwa ambisensowne RNA o długościach około 4,8 kb (RNA M) i 2,9 kb (RNA S). Każdy gen wirusa jest transkrybowany jako oddzielny mRNA, a następnie wykorzystywany do translacji jego produktów białkowych (166). Pierwszych dziewięć nukleotydów na końcu 3' każdego genomowego RNA jest wysoce konserwatywnych i ma odwróconą komplementarność w stosunku do końców 5', co ułatwia parowanie zasad na końcach i tworzenie struktur typu *panhandle*, które sprawiają, że każdy genomowy RNA ma wygląd pseudokolisty (39, 79).

Po wejściu do roślinnej komórki gospodarza genom wirusowy jest replikowany w cytoplazmie dzięki aktywności zależnej od RNA polimerazy RNA (RdRp), kodowanej przez genomowy RNA L (83). Ta komplementarna nić RNA L zawiera pojedynczą ramkę odczytu (ORF), która koduje białko RdRp o masie 331,5 kDa niezbędne do replikacji RNA (83, 170).

RNA M koduje pojedynczą poliproteinę, która jest prekursorem zarówno dla glikoprotein GN, jak i GC. Później ta poliproteina jest trawiona proteolitycznie, aby uzyskać dojrzałe białka GN i GC o masach odpowiednio: 58 i 95 kDa (173).

RNA S koduje białko nukleokapsydu (N) o masie 28,8 kDa. Funkcją białka N jest enkapsulacja wirusowego RNA w otoczce wirusa (133). W komórkach roślinnych białko N lokalizuje się w cytoplazmie jako duże ciała inkluzyjne (131), które mogą gromadzić się w sposób okołojądrowy (40, 110) i są związane z siecią zależną od aktyny i retikulum endoplazmatycznego (48, 49, 130). Białko N oddziałuje z genomowym RNA, a podczas składania cząstek rybonukleoproteiny (RNP) złożonych z RdRp, białka N i genomowego RNA są otoczone cysternami aparatu Golgiego (81). Te cysterny zawierają białka GN i GC, co powoduje powstawanie cząstek wirusa o podwójnej otoczce (81), prawdopodobnie poprzez interakcje GN i GC z wirusowymi RNP (130, 131). Cząsteczki wirusa ostatecznie łączą się ze sobą i z błonami pochodzącymi z retikulum endoplazmatycznego, tworząc w ten sposób duże pęcherzyki, które zostają pokryte pojedynczą otoczką (80, 81, 82). W tej formie wirus jest pobierany przez owady (80, 81). Przypuszcza się, że otoczkowanie umożliwi przeniesienie wirusa przez wciornastki. Nie jest ono jednak konieczne do zainfekowania roślin, o czym świadczy fakt, że izolaty, które nie tworzą cząstek otoczki są zakaźne dla roślin, ale nie podlegają transmisji przez wciornastki (153).

Genomowe RNA M i RNA S kodują również dwa niestrukturalne białka o masach 33,6 i 30 kDa, które są nazwane odpowiednio: NSm i NSs (61, 102). Białka te określane są białkami niestrukturalnymi, ponieważ nie występują w wirionach i są obecne tylko w komórkach zakażonych przez TSWV (166). Białko NSm ułatwia rozprzestrzenianie się wirusa w organizmie gospodarza, podczas gdy białko NSs działa jako supresor wyciszania RNA, w celu pokonania bariery odpornościowej gospodarza (161). Podczas infekcji roślin patogeny wirusowe, w tym TSWV, muszą ominąć mechanizmy obronne gospodarza, takie jak wyciszanie RNA (15, 161). W roślinach białko NSs wiąże małe interferujące RNA (siRNA) i mikroRNA (miRNA), a także długie dwuniciowe dupleksy RNA (64, 143). Pozwala to na zahamowanie zarówno miejscowego, jak i systemowego wyciszania genów u gospodarzy roślinnych (65, 67). Odporność papryki na TSWV warunkowana jest obecnością genu awirulencji Tsw (37, 105). Jej skuteczność zależy od budowy białka NSs. Już pojedyncza zmiana aminokwasu w tym białku w pozycji 104 (T→A) powoduje przełamanie tej odporności (6). Domena N-końcowa w NSs jest ważna dla jego awirulencji i funkcji supresji wyciszania RNA (36). Dwa konserwatywne motywy, GKV/T w pozycjach 181–183 i YL w pozycjach 412–413, mają kluczowe znaczenie dla wyciszania funkcji supresorowej NSs (185). Białka NSs są powszechnie spotykane w bunyawirusach zakażających rośliny i kręgowce (65). Wszystkie te białka działają w wysoce skoordynowany sposób, co pomaga w wystąpieniu infekcji TSWV w komórkach gospodarza. Prawidłowa interakcja między NSm i N jest wymagana do transportu wirusa z komórki do komórki przez plasmodesmy (88). Ostatnio wytworzono strukturę krystaliczną białka N, pokazu-

jąc, że to białko ma domenę składającą się z płata N i C z dodatnio naładowanym rowkiem i potencjalnym miejscem wiązania RNA. Ponadto stwierdzono, że domeny w białku N są flankowane przez ramiona N- i C-końcowe pośredniczące w interakcjach z sąsiednimi podjednostkami (61).

W przypadku białek NSm i NSs, które są kodowane w przeciwnej orientacji w stosunku do pozostałych trzech białek wirusowych, transkrypcja z komplementarnego RNA wirusa daje subgenomowe RNA do translacji tych produktów białkowych. Jak wykazano w przypadku dwóch subgenomowych RNA kodowanych przez RNA S, transkrypcja jest terminowana przez konserwatywne motywy sekwencji na ich końcach 3' tworzących strukturę typu *stem-loop* (169), która zwiększa wydajność translacji (58). Proces ten pozwala wirusowi na skuteczne wykorzystanie maszynarii ekspresyjnej gospodarza w celu nadania priorytetu ekspresji jego własnych białek. Co ciekawe, analiza transkryptomu zakażonych roślin wykazała, że infekcja wirusowa zmienia również metabolizm DNA gospodarza, potencjalnie wpływając na ekspresję i przetwarzanie genów roślinnych podczas procesu infekcji (18, 24, 146).

Wśród tospowirusów przenoszonych przez wciornastki TSWV znajduje się w pierwszej dziesiątce najważniejszych ekonomicznie wirusów roślinnych na świecie (142). Wirus jest przenoszony w sposób trwały wyłącznie przez wciornastki, z których najskuteczniejszym jest wciornastek zachodni [*Frankliniella occidentalis* (Pergande)], chociaż w przypadku tytoniu głównym wektorem jest wciornastek tytoniowiec (*Thrips tabaci*). Dla innych roślin wektorami mogą być wciornastek melonowy (*Thrips palmi*) czy wciornastek chili (*Scirtothrips dorsalis*) (140, 172, 174). Wciornastki to bardzo małe owady (na ogół <1 mm długości), które należą do rzędu *Thysanoptera*. Szacuje się, że istnieje ponad 6000 gatunków wciornastków (16). Najbardziej rozpowszechnione i wydajne wektory TSWV są polifagiczne, co sprzyja rozpowszechnieniu wirusa wśród wielu gatunków roślin. Wciornastki są niebezpieczne nie tylko dlatego, że przenoszą TSWV, ale również ze względu na szkody wynikające z ich żerowania (97). Duże populacje wciornastków na młodych roślinach mogą powodować zahamowanie wzrostu roślin i opóźniać dojrzewanie upraw.

Związek między wciornastkami a wirusem jest szczegółowy, ponieważ dorosłe owady są zdolne do przenoszenia TSWV tylko po tym, jak nabędą wirusa we wczesnym stadium larwalnym (168). Zakażenie i replikacja TSWV wewnątrz wciornastków jest procesem złożonym i podlega wielokrotnym interakcjom między wirusem a białkami gospodarza. Podczas przemieszczania się wirusa z jelita środkowego do gruczołów ślinowych TSWV musi pokonać co najmniej sześć barier błonowych wewnątrz wciornastków (173). Światło jelita środkowego wciornastków jest miejscem, w którym zachodzi początkowa interakcja między glikoproteinami TSWV a receptorami jelita środkowego, po której wirus wnika do komórek jelita żywiciela prawdopodobnie drogą endocytotyczną (173). Z wnętrza komórek jelita środkowego wirus jest przenoszony do sąsiednich komórek jelita środkowego, a także nabywany przez larwy wciornastków. Z komórek jelita środkowego wirus przenosi się do

komórek mięśni trzewnych i pierwotnych gruczołów ślinowych, gdzie się replikuje. Cały cykl namnażania wirusa wewnątrz wciornastków rozpoczyna się od nabycia wirusa przez wciornastki w ich stadiach larwalnych (L1 i L2), przetrwania wirusa w stadiach poczwarki (P1 i P2) oraz akumulacji w gruczołach ślinowych (113, 144). Po zakażeniu gruczołów ślinowych dorosłe osobniki podczas żerowania wraz ze śliną uwalniają wirusa do komórek roślinnych. W związku z tym TSWV replikuje się zarówno w wektorze, jak i w roślinie żywicielskiej. Wykazano, że infekcja TSWV zwiększa płodność wektora, bowiem wzrost jego populacji jest intensywniejszy na zarażonych roślinach w stosunku do niezainfekowanych roślin (9, 106, 118, 151).

Badanie zależności między mianem wirusa u dorosłego wciornastaka zachodniego a zdolnością zakażenia roślin ujawniło silny pozytywny związek między mianem wirusa a częstotliwością przenoszenia na gospodarza roślinnego, zarówno w przypadku wciornastków męskich, jak i żeńskich (141). Badania wskazują, że miano wirusa lub jego zdolność do rozprzestrzeniania się w ciele owada jest związana z kompetencją wektora, a słaba transmisja TSWV może wiązać się z niezdolnością wirusa do przeniesienia się z jelita środkowego do gruczołów ślinowych. W badaniach Nagata i in. (113) TSWV był obecny w gruczołach ślinowych kompetentnych dorosłych osobników wciornastków *T. tabaci* i *F. occidentalis*, ale nie został wykryty w gruczołach ślinowych dorosłych osobników niekompetentnych *T. tabaci*, które były karmione na zainfekowanych liściach w pierwszych stadiach rozwojowych. Infekcje u wciornastków z populacji niekompetentnej ograniczały się do tkanek jelita środkowego. Nieefektywna transmisja wirusa może być również spowodowana ograniczoną replikacją wirusa w populacjach *T. tabaci* (17). Ponadto izolaty TSWV różnią się wydajnością przenoszenia przez wciornastki, a zmienność ta wynika ze zróżnicowania genetycznego zarówno wirusa, jak i wektora, na którą ma również wpływ roślina żywicielska. Jacobson i Kennedy (73) wykorzystali linie izożeńskie (litokotyczne) *T. tabaci* oraz izolaty TSWV pochodzące z kilku lokalizacji geograficznych i przetestowali skuteczność transmisji dla różnych kombinacji izolatów wirusa i wektora. Eksperymenty wykazały, że genetycznie podobne wciornastki przenosiły różne izolaty TSWV z odmienną wydajnością, co wskazuje, że zróżnicowanie genetyczne wirusa miało wpływ na jego transmisję. Dalsze badania wykazały, że ten sam izolat wirusa był przenoszony z różną wydajnością przez wielorakie izolacje wciornastków.

Infekcja TSWV wyzwała odpowiedź immunologiczną *Frankliniella occidentalis*. Ustalono, że aktywowane geny ulegały zwiększonej transkrypcji i obejmowały: geny kodujące peptydy przeciwdrobnoustrojowe, takie jak defensyna i cekropina, geny lektyny, która jest zaangażowana w rozpoznawanie patogenów, geny receptorów aktywujących wrodzoną odpowiedź immunologiczną (Toll-3) oraz geny kodujące elementy szlaków transdukcji sygnału aktywowane przez receptory Toll-3-podobne, takie jak kinaza JNK (107). Chociaż większość udokumentowanych skutków obecności wirusa jest pozytywna, istnieją również doniesienia o negatywnym (31, 159) i neutralnym (176) wpływie TSWV na wciornastki. W przeciwieństwie do

*F. occidentalis*, w przypadku hodowli wciornastków *Frankliniella fusca* na roślinach zakażonych TSWV czas ich rozwoju do osiągnięcia dojrzałości jest wydłużony, a przeżycie i wielkość dorosłych osobników zmniejszona i dodatkowo modulowana przez czynniki biotyczne i abiotyczne (159). Efekty te zależały od izolatu TSWV i były silniejsze w wyższych temperaturach. Glikoproteiny TSWV odgrywają główną rolę w całym cyklu życiowym wirusa wewnątrz wciornastków. Wykazano, że glikoproteina GC jest prawdopodobnie wirusowym białkiem fuzyjnym analogicznym do podobnych białek w bunyawirusach zakażających zwierzęta, podczas gdy mutacje w ORF glikoproteiny GN powodują utratę zdolności przenoszenia TSWV przez wciornastki (114, 153). Stwierdzono, że specyficzna niesynonimiczna mutacja w ORF glikoproteiny GN hamuje przenoszenie wirusa przez wciornastki, jednak nie wpływa na tworzenie wirionów (153). W przeciwieństwie do tego zjawiska mutacje delecyjne w ORF glikoprotein mają wpływ na tworzenie otoczki wirusa i utratę zdolności do jego transmisji przez wciornastki (114). Testy wiązania *in vivo* wykazały, że rozpuszczalna forma glikoproteiny GN TSWV wiąże się z komórkami nabłonka jelita środkowego wciornastków i zmniejsza przyswajanie TSWV, co wskazuje, że GN może działać jako wirusowy ligand, który pośredniczy w przyłączaniu TSWV do receptorów jelita środkowego wciornastków (175). Ponadto zaobserwowano, że karmienie wciornastków glikoproteiną GN powoduje znaczne zmniejszenie przenoszenia przez nich wirusa, co sugeruje, że transmisję TSWV przez wciornastki można ograniczyć przez egzogenną aplikację wirusowej glikoproteiny (173). Oprócz glikoprotein wykazano również udział białka NSs w przenoszeniu wirusa przez wciornastki (105). Zaobserwowano, że TSWV niosące skrócone białko NSs nie może być przenoszone przez wciornastki, co wskazuje na kluczową rolę białka NSs w transmisji TSWV przez te owady (105).

Wśród mechanizmów molekularnych leżących u podstaw interakcji wirus–wciornastek–roślina Abe i in. (1) wykazali rolę antagonistycznego działania między kwasem salicylowym (SA) i kwasem jasmonowym (JA) w indukowanej systemicznej odporności roślin przeciwko patogenom. Autorzy zasugerowali, że zwiększona wydajność wciornastków na roślinach zakażonych TSWV była spowodowana zmniejszeniem obrony roślin regulowanej przez kwas jasmonowy (JA), która u roślin zakażonych wirusem była tłumiona przez wzrost odpowiedzi obronnych regulowanych przez kwas salicylowy (SA). Inne badania dowodzą, że niestrukturalne białko NSs hamuje biosyntezę monoterpenu, o których wiadomo, że są repelentami *F. occidentalis* poprzez bezpośrednią interakcję z czynnikami transkrypcyjnymi MYC, kluczowymi regulatorami szlaku sygnałowego kwasu jasmonowego (JA) (180).

Od chwili wprowadzenia zainfekowanego materiału roślinnego na dany obszar, to wciornastki zaczynają odgrywać kluczową rolę w rozprzestrzenianiu się wirusa. W związku z tym ilość początkowego inokulum, liczba gatunków wciornastków i podatnych roślin żywicielskich są ważnymi czynnikami w rozprzestrzenianiu się wirusa w warunkach polowych (26). Ponieważ tylko wciornastki, które nabyły wirusa jako

larwy są w stanie przetrwać wirusa jako osobniki dorosłe (174), dlatego kluczowe dla rozprzestrzeniania się wirusa stają się czynniki pogodowe i klimatyczne, które sprzyjają wzrostowi, rozmnażaniu i przemieszczaniu się wciornastków z rośliny na roślinę (124). Nawietrzne krawędzie pól, gdzie występują zainfekowane wirusem TSWV chwasty, w pobliżu upraw polowych, są bardziej podatne na zakażenie (177). Wirus może przetrwać zarówno w gospodarzach roślinnych, jak i owadziach, a szeroki zakres żywicieli roślinnych umożliwia wirusowi przetrwanie i zimowanie w różnych chwastach. Również klimat, w którym ani temperatura, ani opady nie zakłócają wzrostu chwastów oraz populacji wciornastków, sprzyja rozprzestrzenianiu się TSWV (21, 112). Ważnym aspektem ograniczania rozwoju infekcji TSWV jest zastosowanie insektycydów lub wprowadzenie dostępnych w handlu drapieżników wciornastków, takich jak *Amblyseius cucumeris*, *Hypoaspis miles* i *Orius insidiosus* (134). Można również zastosować zabiegi kulturowe polegające na izolacji upraw, wykorzystaniu siatek ochronnych lub innych sposobów ograniczania populacji wektorów (27, 124). Innym sposobem walki z TSWV jest wysadzenie roślin wolnych od choroby oraz minimalizowanie obecności chwastów i samosiewów na polach (77, 124). Stosowanie chemicznych środków do zwalczania wciornastków doprowadziło do rozwoju populacji wciornastków odpornych na insektycydy (11), a środki owadobójcze do listne są często stosunkowo nieskuteczne w hamowaniu rozprzestrzeniania się wirusa w warunkach polowych (26, 124). Najskuteczniejszą metodą ograniczania infekcji powodowanych przez TSWV i zapobiegania jego rozprzestrzenianiu się jest wdrażanie do uprawy odmian odpornych. Takie odmiany wprowadzono u pomidora (gen Sw-5) i papryki (gen Tsw), a w przypadku tytoniu prowadzone są prace hodowlane w tym kierunku (12, 158, 165). Ponieważ dostępne źródła odporności na TSWV są ograniczone, a dodatkowo w ostatnich latach coraz częściej pojawiają się izolaty wirusa przelamujące wymienione źródła odporności, prowadzone są badania nad transgenicznymi odmianami odpornymi. Poprzez wprowadzenie wirusowego materiału genetycznego do genomu gospodarza można aktywować naturalny mechanizm obrony roślin przed wirusami – wyciszanie RNA. W wielu przypadkach udało się uzyskać taką odporność na wirusy (14, 126). Obecnie jednak żadne odmiany transgeniczne nie są dostępne na rynku. Niedawne odkrycie, że dwuniciowy RNA ma działanie owadobójcze u wciornastków, otwiera możliwości opracowania nowych metod ograniczania populacji wektora (8). Odporność, która zmniejsza przeżywalność lub płodność wciornastków prawdopodobnie pomogłaby w opanowaniu rozprzestrzeniania się wirusa, szczególnie że wciornastki muszą nabywać wirusa jako larwy i nie mogą łatwo przemieszczać się między roślinami, aż do osiągnięcia dorosłości.

## Literatura

1. Abe H., Tomitaka Y., Shimoda T., Seo S., Sakurai T., Kugimiya S.: Antagonistic plant defense system regulated by phytohormones assists interactions among vector insect, thrips and a Tospovirus. *Plant & Cell Physiology*, 2012, **53**: 204-212.



2. Abdelkhalik A., Behiry S.I., Al-Askar A.A.: *Bacillus velezensis* PEA1 Inhibits *Fusarium oxysporum* Growth and Induces Systemic Resistance to Cucumber Mosaic Virus. *Agronomy*, 2020, **10**, 1312.
3. Adams M.J.: Changes to taxonomy and the international code of virus classification and nomenclature ratified by the international committee on taxonomy of viruses. *Archives of Virology*, 2017, **162**: 2505-2538.
4. Ali A., Kobayashi M.: Seed transmission of Cucumber mosaic virus in pepper. *Journal of Virological Methods*, 2010, **163**: 234-237.
5. Ali A., Li H., Schneider W.L., Sherman D.J., Gray S., Smith D., Roossinck M.J.: Analysis of genetic bottlenecks during horizontal transmission of Cucumber mosaic virus. *Journal of Virology*, 2006, **80**: 8345-8350.
6. Almási A., Nemes K., Csömör Z., Tóbiás I., Palkovics L., Salánki K.: A single point mutation in Tomato spotted wilt virus NSs protein is sufficient to overcome Tsw-gene-mediated resistance in pepper. *Journal of General Virology*, 2017, **98**: 1521-1525.
7. Babovic M., Bulajic A., Delibasic G., Milijic S., Todorovic D.: Role of bean seed in transmitting Bean common mosaic virus and Cucumber mosaic virus. *Acta Horticulturae*, 1997, **462**: 253-258.
8. Badillo-Vargas I.E., Rotenberg D., Schneweis B.A., Whitfield A.E.: RNA interference tools for the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Insect Physiology*, 2015, **76**: 36-46.
9. Belliure B., Janssen A., Maris P.C., Peters D., Sabelis M.W.: Herbivore arthropods benefit from vectoring plant viruses. *Ecology Letters*, 2005, **8**: 70-79.
10. Betancourt M., Fereres A., Fraile A., Garcia-Arenal F.: Estimation of the effective number of founders that initiate an infection after aphid transmission of a multipartite plant virus. *Journal of Virology*, 2008, **82**: 12416-12421.
11. Bielz A.P.: Insecticide resistance management strategies against the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Pest Management Science*, 2008, **64**: 1131-1138.
12. Boiteux L.S., Deavila A.C.: Inheritance of a resistance specific to Tomato spotted wilt tospovirus in *Capsicum chinense* 'PI-159236'. *Euphytica*, 1994, **75**:139-142.
13. Bonnetta J., Frailea A., Sacrista ña S., Malpicab J.M., Garcí 'a-Arenal F.: Role of recombination in the evolution of natural populations of Cucumber mosaic virus, a tripartite RNA plant virus. *Virology*, 2005, **332**: 359-368.
14. Bucher E., Lohuis D., van Poppel P.M.J.A., Geerts-Dimitriadou C., Goldbach R., Prins M.: Multiple virus resistance at a high frequency using a single transgene construct. *Journal of General Virology*, 2006, **87**: 3697-3701.
15. Bucher E., Sijen T., deHaan P., Goldbach R., Prins M.: Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *Journal of Virology*, 2003, **77**: 1329-1336.
16. Buckman R.S., Mound L.A., Whiting M.F.: Phylogeny of thrips (Insecta: *Thysanoptera*) based on five molecular loci. *Systematic Entomology*, 2013, **38**: 123-133.
17. Cabrera-Losa J.C., Kennedy G.G.: *Thrips tabaci* and Tomato spotted wilt virus: inheritance of vector competence. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2007, **124**: 161-166.
18. Catoni M., Miozzi L., Fiorilli V., Lanfranco L., Accotto G.P.: Comparative analysis of expression profiles in shoots and roots of tomato systemically infected by Tomato spotted wilt virus reveals organspecific transcriptional responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, **22**: 1504-1513.
19. Chalam V.C., Parakh D.B., Khetarpal R.K., Maurya A.K., Anju J., Singh S.: Interception of seed-transmitted viruses in cowpea and mungbean germplasm imported during 2003. *Indian Journal of virology*, 2008, **19**: 12-16.

20. Chapman E.J., Prokhnovsky A.I., Gopinath K., Dolja V.V., Carrington J.C.: Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes & Development*, 2004, **18**: 1179-1186.
21. Chappeil T.M., Beaudoin A.L.P., Kennedy G.G.: Interacting virus abundance and transmission intensity underlie Tomato spotted wilt virus incidence: an example weather-based model for cultivated tobacco. *PLoS One*, 2013, **8**: e73321.
22. Chare E.R., Holmes E.C.: A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. *Archives of Virology*, 2006, **151**: 933-946.
23. Chare E.R., Gould E.A., Holmes E.C.: Phylogenetic analysis reveals a low rate of homologous recombination in negative sense RNA viruses. *Journal of General Virology*, 2003, **84**: 2691-2703.
24. Choi H., Jo Y., Lian S., Jo K.M., Chu H.: Comparative analysis of chrysanthemum transcriptome in response to three RNA viruses: Cucumber mosaic virus, Tomato spotted wilt virus and Potato virus X. *Plant Molecular Biology*, 2015, **88**: 233-248.
25. Csinos A.: Symptomology of TSWV in tobacco. In: *Tospoviruses in solanaceous and other crops in the coastal plain of Georgia*. University of Georgia CAES Bulletin, 2009, **1354**: 31-34.
26. Culbreath A.K., Todd J.W., Brown S.L.: Epidemiology and management of tomato spotted wilt in peanut. *Annual Review of Phytopathology*, 2003, **41**: 53-75.
27. David M.K., Peter M.H.: *Fields Virology* (Lippincott Williams & Wilkins, ed. 6), 2013, pp. 2264.
28. de Haan P., de Avila A.C., Kormelink R., Westerbroek A., Gielen J.J., Peters D., Goldbach R.: The nucleotide sequence of the S RNA of impatiens necrotic spot virus, a novel tospovirus. *FEBS Letters*, 1992, **306**: 27-32.
29. de Haan P., Kormelink R., de Oliveira Resende R., van Poelwijk F., Peters D., Goldbach R.: Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *Journal of General Virology*, 1991, **72**: 2207-2216.
30. de Haan P., Wagemakers L., Peters D., Goldbach R.: The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. *Journal of General Virology*, 1990, **71**: 1001-1007.
31. DeAngelis J., Sether D., Rossignol P.: Survival, development, and reproduction in western flower thrips (*Thysanoptera: Thripidae*) exposed to impatiens necrotic spot virus. *Environmental Entomology*, 1993, **22**: 1308-1312.
32. de Ávila A.C., de Haan P., Kormelink R., de Resende R.O., Goldbach R.W., Peters D.: Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *Journal of General Virology*, 1993a, **74(2)**: 153-159.
33. de Avila A.C., de Haan P., Smeets M., Resende R. de O., Kormelink R., Kitajima E.W., Goldbach R.W., Peters D.: Distinct levels of relationships between tospoviruses isolates. *Archives of Virology*, 1993b, **128**: 211-227.
34. de Avila A.C., Huguenot C., Resende R. de O., Kitajima E.W., Goldbach R.W., Peters D.: Serological differentiation of 20 isolates of tomato spotted wilt virus, 1. *Gen. Viral.* 1990, **71**: 2801-2807.
35. Debreczeni D.E., López C., Aramburu J., Darós J.A., Soler S., Galipienso L., Falk B.W., Rubio L.: Complete sequence of three different biotypes of tomato spotted wilt virus (wild type, tomato Sw-5 resistance-breaking and pepper Tsw resistance-breaking) from Spain. *Archives of Virology*, 2015, **160**: 2117-2123.
36. de Ronde D., Pasquier A., Ying S., Butterbach P., Lohuis D., Kormelink R.: Analysis of Tomato spotted wilt virus NSs protein indicates the importance of the N-terminal domain for avirulence and RNA silencing suppression. *Molecular Plant Pathology*, 2014, **15**: 185-195.
37. de Ronde D., Butterbach P., Lohuis D., Hedil M., van Lent J.W., Kormelink R.: Tsw gene-based resistance is triggered by a functional RNA silencing suppressor protein of the Tomato spotted wilt virus. *Molecular Plant Pathology*, 2013, **14**: 405-415.
38. de Wispelaere M., Rao A.L.N.: Production of Cucumber mosaic virus RNA5 and its role in RNA recombination. *Virology*, 2009, **384**: 179-191.

39. Dehaan P, Wagemakers L, Peters D, Goldbach R.: Molecular-cloning and terminal sequence determination of the S RNA and MRNA of Tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology*, 1989, **70**: 3469-3473.
40. Dietzgen R.G., Martin K.M., Anderson G., Goodin M.M.: In planta localization and interactions of impatiens necrotic spot tospovirus proteins. *Journal of General Virology*, 2012, **93**: 2490-2495.
41. Ding S.W., Li W.X., Symons R.H.: A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO Journal*, 1995, **14**: 5762-5772.
42. Ding S.W., Anderson B.J., Haase H.R., Symons R.H.: New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. *Virology*, 1994, **198**: 593-601.
43. Divéki Z., Salánki K., Balázs E.: The necrotic pathotype of the Cucumber mosaic virus (CMV) ns strain is solely determined by amino acid 461 of the 1a protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2004, **17**: 837-845.
44. Du Z.Y., Chen F.F., Liao Q.S., Zhang H.R., Chen Y.F., Chen J.S.: 2b ORFs encoded by subgroup IB strains of cucumber mosaic virus induce differential virulence on *Nicotiana* species. *Journal of General Virology*, 2007, **88**: 2596-2604.
45. Edwards J.R., Christie R.G.: Cucumoviruses. *CRC Handbook of viruses infecting legumes*. CRC Press, Boca Raton, Fla, 1991, p. 293-319.
46. Elliott R.M.: *The Bunyaviridae*. Plenum Press, New York and London, 1996, p. 1-18.
47. Escriu F., Perry K.L., Garcia-Arenal F.: Transmissibility of Cucumber mosaic virus by *Aphis gossypii* correlates with viral accumulation and is affected by the presence of its satellite RNA. *Phytopathology*, 2000, **90**: 1068-1072.
48. Feng M., Cheng R., Chen M., Guo R., Li L., Feng Z., Wu J., Xie L., Hong J., Zhang Z., Kormelink R., Tao X.: Rescue of tomato spotted wilt virus entirely from complementary DNA clones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020, **117**(2): 1181-1190.
49. Feng Z.K., Chen X.J., Bao Y.Q., Dong J.H., Zhang Z.K., Tao X.R.: Nucleocapsid of Tomato spotted wilt tospovirus forms mobile particles that traffic on an actin/endoplasmic reticulum network driven by myosin XI-K. *New Phytologist*, 2013, **200**: 1212-1224.
50. Finetti Sialer M.M., Cillo F., Barbarossa L., Gallitelli D.: Differentiation of Cucumber mosaic virus subgroups by RT-PCR RFLP. *Journal of Plant Pathology*, 1999, **81**: 145-148.
51. Francki R.I.B., Fauquet C.M., Knudson D.D., Brown F.: Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology Supplementum*, 1991, p. 21-450.
52. Francki R.I.B., Fauquet C.M., Knudson D., Brown F.: Classification and nomenclature of viruses: Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, *Archives of Virology Suppl.*, 1991, **2**: 281.
53. Fulton R.W.: Resistance in tobacco to cucumber mosaic virus infection. (Abstr.) *Phytopathology*, 1953, **43**: 472.
54. Fulton J.P.: Studies on strains of cucumber virus 1 from spinach. *Phytopathology*, 1950, **40**: 729-736.
55. Galeto R., Negroni M.: Mechanistic features of recombination in HIV. *AIDS Rev.*, 2005, **7**: 92-102.
56. Garcia-Arenal F., McDonald B.A.: An analysis of the durability of the resistance to plant viruses. *Phytopathology*, 2003, **93**: 941-952.
57. Garcia-Arenal F., Fraile A., Malpica J.M.: Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology*, 2001, **39**: 157-186.
58. Geerts-Dimitriadou C., Lu Y.Y., Geertsema C., Goldbach R., Kormelink R.: Analysis of the Tomato spotted wilt virus ambisense S RNA-encoded hairpin structure in translation. *PLoS One*, 2012, **7**: e31013.

59. Gilbertson R.L., Batuman O., Webster C.G., Adkins S.: Role of the insect supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the emergence and global spread of plant viruses. Annual Review of Virology, 2015, **2**: 67-93.
60. Guo H.S., Xie Q., Fei J.F., Chua N.H.: MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to down regulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development. Plant Cell, 2005, **17**: 1376-1386.
61. Guo Y., Liu B., Ding Z., Li G., Liu M., Zhu D., Sun Y., Dong S., Lou Z.: A distinct mechanism for the formation of the ribonucleoprotein complex of the Tomato spotted wilt virus. Journal of Virology, 2017 Nov 14, **91(23)**: e00892-17. doi: 10.1128/JVI.00892-17.
62. Gildow F.E., Shah D.A., Sackett W.M., Butzler T., Nault B.A., Fleischer S.J.: Transmission efficiency of Cucumber mosaic virus by aphids associated with virus epidemics in snap bean. Phytopathology, 2008, **98**: 1233-1241.
63. Hajimorad M.R., Ghabrial S.A., Roossinck M.: De novo emergence of a novel satellite RNA of Cucumber mosaic virus following serial passages of the virus derived from RNA transcripts. Archives of Virology, 2009, **154**: 137-140.
64. Hedil M., de Ronde D., Kormelink R.: Biochemical analysis of NSs from different tospoviruses. Virus Research, 2017, **242**: 149-155.
65. Hedil M., Kormelink R.: Viral RNA silencing suppression: The enigma of Bunyavirus NSs proteins. Viruses, 2016, **8**: 1-208.
66. Hu Z.Z., Feng Z.K., Zhang Z.J., Liu Y.B., Tao X.R.: Complete genome sequence of a tomato spotted wilt virus isolate from China and comparison to other TSWV isolates of different geographic origin. Archives of Virology, 2011, **156**: 1905-1908.
67. Hedil M., Sterken M.G., de Ronde D., Lohuis D., Kormelink R.: Analysis of tospovirus NSs proteins in suppression of systemic silencing. PLoS One, 2015, **10**: e0134517.
68. Hayes R.J., Buck K.W.: Complete replication of a eukaryotic virus RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase. Cell, 1990, **63**: 363-368.
69. Hollings M., Stone O.M., Brunt A.A.: Cucumber mosaic virus. Glasshouse Crops Research Institute Ann. Rept., 1967, p. 95-98.
70. Holmes E.C., Worobey M., Rambaut A.: Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. Molecular Biology and Evolution, 1999, **16**: 405-409.
71. Hu J.S., Li H.P., Barry K., Wang M., Jordan R.: Comparison of dot-blot, Elisa, and RT-PCR assays for detection of two Cucumber mosaic virus isolates infecting banana in Hawaii. Plant Disease, 1995, **79**: 902-906.
72. Ilardi V., Mazzei M., Loreti S., Tomassoli L., Barba M.: Biomolecular and serological methods to identify strains of Cucumber mosaic cucumovirus on tomato. EPPO Bulletin, 1995, **25**: 321-327.
73. Jacobson A.L., Kennedy G.G.: Specific insect-virus interactions are responsible for variation in competency of different *Thrips tabaci* isolines to transmit different Tomato spotted wilt virus isolates. PLoS One, 2013, **8**: e54567.
74. Jacquemond M., Tepfer M.: Satellite RNA-mediated resistance to plant viruses: Are the ecological risks well assessed? In: Plant Virus Disease Control, A. Hadidi, R.K. Khetarpal, H. Koganezawa (eds). APS Press, MN, USA, 1998, pp. 94-120.
75. Ji L.H., Ding S.H.: The suppressor of transgene RNA silencing encoded by Cucumber mosaic virus interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2001, **14**: 715-724.
76. Jones R.A.C.: Occurrence of virus infection in seed stocks and 3-year-old pastures of lucerne (*Medicago sativa*). Australian Journal of Agricultural Research, 2004a, **55**: 757-764.
77. Jones R.A.C.: Using epidemiological information to develop effective integrated virus disease management strategies. Virus Research, 2004b, **100**: 5-30.

78. Kaper J.M., Waterworth H.E.: Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis, ed. E. Kurstak, North-Holland, NY: Elsevieri, 1981, pp. 257-332.
79. Kellmann J.W., Liebisch P., Schmitz K.P., Piechulla B.: Visual representation by atomic force microscopy (AFM) of Tomato spotted wilt virus ribonucleoproteins. *Biological Chemistry*, 2001, **382**: 1559-1562.
80. Kikkert M., Verschoor A., Kormelink R., Rottier P., Goldbach R.: Tomato spotted wilt virus glycoproteins exhibit trafficking and localization signals that are functional in mammalian cells. *Journal of Virology*, 2001, **75**: 1004-1012.
81. Kikkert M., Van Lent J., Storms M., Bodegom P., Kormelink R., Goldbach R.: Tomato spotted wilt virus particle morphogenesis in plant cells. *Journal of Virology*, 1999, **73**: 2288-2297.
82. Kikkert M., van Poelwijk F., Storms M., Kassies W., Bloksma H.: A protoplast system for studying Tomato spotted wilt virus infection. *Journal of General Virology*, 1997, **78**: 1755-1763.
83. Kim J.H., Kim Y.S., Jang S.W., Jeon Y.H.: Complete genome sequence of tomato spotted wilt virus from paprika in Korea. *International Journal of Phytopathology* 2013, **2**: 121-136.
84. Kim M.J., Kim H.R., Paek K.H.: *Arabidopsis* tonoplast proteins TIP1 and TIP2 interact with the cucumber mosaic virus 1a replication protein. *Journal of General Virology*, 2006, **87**: 3425-3431.
85. Kim S.H., Palukaitis P., Park Y.I.: Phosphorylation of cucumber mosaic virus RNA polymerase 2a protein inhibits formation of replicase complex. *EMBO Journal*, 2002, **21**: 2292-2300.
86. Kim C.H., Palukaitis P.: The plant defense response to Cucumber mosaic virus in cowpea is elicited by the viral polymerase gene and affects virus accumulation in single cells. *EMBO Journal*, 1997, **16**: 4060-4068.
87. Kormelink R., Garcia M.L., Goodin M., Sasaya T., Haenni A.L.: Negative-strand RNA viruses: The plant-infecting counterparts. *Virus Research*, 2011, **162**: 184-202.
88. Kormelink R., Storms M., Van Lent J., Peters D., Goldbach R.: Expression and subcellular location of the NSM protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology*, 1994, **200**: 56-65.
89. Kormelink R., DeHaan P., Meurs C., Peters D., Goldbach R.: The nucleotide sequence of the MRNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *Journal of General Virology*, 1992, **73**: 2795-2804.
90. Kosaka Y., Fukunishi T.: Multiple inoculation with three attenuated viruses for the control of cucumber virus disease. *Plant Disease*, 1997, **81**: 733-738.
91. Lai M.M.C.: RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol Reviews*, 1992, **56**: 61-79.
92. Law M.D., Speck J.V., Moyer J.W.: The MRNA of Impatiens necrotic spot tospovirus (*Bunyaviridae*) has an ambisense genomic organisation, *Virology*, 1992, **188(2)**: 732-741.
93. Law M.D., Moyer J.W.: A tomato spotted wilt virus with a serological distinct N protein, *Journal of General Virology*, 1990, **71**: 933-938.
94. Latham L.J., Jones R.A.C., McKirdy S.J.: Cucumber mosaic cucumovirus infection of cool-season crop, annual pasture, and forage legumes: Susceptibility, sensitivity, and seed transmission. *Australian Journal of Agricultural Research*, 2001, **52**: 683-697.
95. Lecoq H., Pitrat M.: Field experiments on the integrated control of aphid-borne viruses in muskmelon. In: *Plant virus epidemiology. The spread and control of insect-borne viruses*, R.T. Plumb, J.M. Thresh (eds). Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 1983, pp. 169-176.
96. Lee G.H., Ryu C.M.: Spraying of leaf-colonizing *Bacillus amyloliquefaciens* protects pepper from Cucumber mosaic virus. *Plant Disease*, 2016, **100**: 2099-2105.
97. Lewis T.: *Thrips as Crop Pests*. Wallingford, UK: CAB Int. 1997, pp. 736.
98. Lewsey M.G., Murphy A.M., Maclean D., Dalchau N., Westwood J.H., Macaulay K., Bennett M.H., Moulin M., Hanke D.E., Powell G., Smith A.G., Carr J.P.: Disruption of two defensive signaling pathways by a viral RNA silencing suppressor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2010, **23**: 835-845.

99. Lewsey M., Robertson F.C., Canto T, Palukaitis P., Carr J.P.: Selective targeting of miRNA-regulated plant development by a viral counter-silencing protein. *Plant Journal*, 2007, **50**: 240-252.
100. Li N., Yu Ch., Yin Y., Gao S., Wang F., Jiao Ch., Yao M.: Pepper crop improvement against cucumber mosaic virus (CMV): A Review. *Frontiers in Plant Science*, 2020, **11**: 1-15.
101. Li S.: Advances in main vegetable crops breeding for diseases resistance in China. Beijing: Science Press, 1995, p. 78-94.
102. Lovato F.A., Inoue-Nagata A.K., Nagata T., de Ávila A.C., Pereira L.A.R., Resende R.O.: The N protein of Tomato spotted wilt virus (TSWV) is associated with the induction of programmed cell death (PCD) in *Capsicum chinense* plants, a hypersensitive host to TSWV infection. *Virus Research*, 2008, **137**: 245-252.
103. Makko K.M., Attar N.: Seed transmission of Cucumber mosaic virus and Alfalfa mosaic virus in lentil seeds. *Arab Journal of Plant Protection*, 2003, **21**: 49-52.
104. Mangrauthia S.K., Parameswari B., Jain R.K., Praveen S.: Role of genetic recombination in the molecular architecture of Papaya ringspot virus. *Biochem Genet*, 2008, **46**: 835-846.
105. Margaria P., Bosco L., Vallino M., Ciuffo M., Mautino G.C., Tavella L., Turina M.: The NSs protein of tomato spotted wilt virus is required for persistent infection and transmission by *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Virology*, 2014, **88**: 5788-5802.
106. Maris P.C., Joosten N.N., Goldbach R.W., Peters D.: Tomato spotted wilt virus infection improves host suitability for its vector *Frankliniella occidentalis*. *Phytopathology*, 2004, **94**: 706-711.
107. Medeiros R.B., Resende R. de O., de Avila A.C.: The Plant Virus Tomato Spotted Wilt Tosopovirus Activates the Immune System of Its Main Insect Vector, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Virology*, 2004, **78(10)**: 4976-4982.
108. Mochizuki T., Ohki S.T.: Cucumber mosaic virus: viral genes as virulence determinants. *Molecular Plant Pathology*, 2012, **13(3)**: 217-225.
109. Mochizuki T., Ohki S.T.: Amino acid 129 in the coat protein of cucumber mosaic virus primarily determines invasion of the shoot apical meristem of tobacco plants. *Journal of General Plant Pathology* 2005, **71**: 326-332.
110. Montero-Astua M.: Unveiling and blocking the interaction between Tomato spotted wilt virus and its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. PhD Diss., Kansas State Univ., 2012, pp. 163.
111. Moreno I.M., Thompson J.R., Garcia-Arenal F.: Analysis of the systemic colonization of cucumber plants by Cucumber green mottle mosaic virus. *Journal of General Virology*, 2004, **85**: 749-759.
112. Morsello S.C., Kennedy G.G.: Spring temperature and precipitation affect tobacco thrips, *Frankliniella fusca*, population growth and Tomato spotted wilt virus spread within patches of the winter annual weed *Stellaria media*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2009, **130**: 138-148.
113. Nagata T., Inoue-Nagata A.K., van Lent J., Goldbach R., Peters D.: Factors determining vector competence and specificity for transmission of Tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology*, 2002, **83**: 663-671.
114. Nagata T., Inoue-Nagata K., Prins M., Goldbach R., Peters D.: Impeded thrips transmission of defective tomato spotted wilt virus isolates. *Phytopathology*, 2000, **90**: 454-459.
115. Ng J.C.K., Perry K.L.: Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Molecular Plant Pathology*, 2004, **5**: 501-511.
116. Nitta N., Takanami Y., Kuwata S., Kubo S.: Inoculation of RNAs 1 and 2 of cucumber mosaic virus induces viral RNA replication activity in tobacco mesophyll protoplasts. *Journal of General Virology*, 1988, **69**: 2696-2700.
117. Odedara O.O., Hughes J.D., Ayo-John E.I.: Diagnosis, occurrence and seed transmission studies of viruses infecting four *Centrosema* species in Nigeria. *Tropical Science*, 2007, **47**: 244-252.

118. O g a d a P.A., M a i s s E., P o e h l i n g H.M.: Influence of tomato spotted wilt virus on performance and behaviour of western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*). Journal of Applied Entomology, 2013, **137**: 488-498.
119. O'K e e f e D.C., B e r r y m a n D.I., C o u t t s B.A., J o n e s R.A.C.: Lack of seed coat contamination with Cucumber mosaic virus in lupin permits reliable, large-scale detection of seed transmission in seed samples. Plant Disease, 2007, **91**: 504-508.
120. O l i v e r J.E., W h i t f i e l d A.E.: The genus Tospovirus: Emerging Bunyaviruses that threaten food security. Annual Review of Virology, 2016, **3**: 101-124.
121. O w e n J., S h i n t a k u M., A e s c h l e m a n P., T a h a r S.F., P a l u k a i t i s P.: Nucleotide sequence and evolutionary relationships of Cucumber mosaic virus (CMV) strains, CMV RNA 3. Journal of General Virology, 1990, **71**: 2243-2249.
122. O w e n J., P a l u k a i t i s P.: Characterization of Cucumber mosaic virus I: molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. Virology, 1988, **166**: 495-502.
123. P a l u k a i t i s P., R o o s s i n c k M.J., D i e t z g e n R.G., F r a n c k i R.I.B.: Cucumber mosaic virus. Advances in Virus Research, 1992, **41**: 281-348.
124. P a p p u H.R., J o n e s R.A., J a i n R.K.: Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. Virus Research, 2009, **141**: 219-236.
125. P a r k K.H., C h a B.J.: Detection of TMV, ToMV and CMV from tomato seeds and plants. Research in Plant Disease, 2002, **8**: 101-106.
126. P e n g J.C., C h e n T.C., R a j a J.A.J., Y a n g C.F., C h i e n W.C.: Broad-spectrum transgenic resistance against distinct tospovirus species at the genus level. PLoS One, 2014, **9**: e96073.
127. P l y u s n i n A., E l l i o t t R.M.: The Bunyaviridae: Molecular and cellular biology (Caister Academic Press), 2011, pp. 222.
128. P o s a d a D., C r a n d a l l K.A.: The effect of recombination on accuracy of phylogeny estimation. J Mol Evol., 2002, **54**: 396-402.
129. R e q u e n a A., S i m o n - B u e l a L., S a l c e d o G., G a r c i a - A r e n a l F.: Potential involvement of a cucumber homolog of phloem protein 1 in the long-distance movement of Cucumber mosaic virus particles. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, **19**: 734-746.
130. R i b e i r o D., J u n g M., M o l i n g S., B o r s t J.W., G o l d b a c h R., K o r m e l i n k R.: The cytosolic nucleoprotein of the plant-infecting bunyavirus Tomato spotted wilt recruits endoplasmic reticulum-resident proteins to endoplasmic reticulum export sites. Plant Cell, 2013, **25**: 3602-3614.
131. R i b e i r o D., B o r s t J.W., G o l d b a c h R., K o r m e l i n k R.: Tomato spotted wilt virus nucleocapsid protein interacts with both viral glycoproteins Gn and Gc in planta. Virology, 2009, **383**: 121-130.
132. R i b e i r o D.: Tomato spotted wilt virus glycoproteins induce the formation of endoplasmic reticulum- and Golgi-derived pleomorphic membrane structures in plant cells. Journal of General Virology, 2008, **89**: 1811-1818.
133. R i c h m o n d K.E., C h e n a u l t K., S h e r w o o d J.L., G e r m a n T.L.: Characterization of the nucleic acid binding properties of tomato spotted wilt virus nucleocapsid protein. Virology, 1998, **248**: 6-11.
134. R i l e y D.G., P a p p u H.R.: Tactics for management of thrips (*Thysanoptera: Thripidae*) and Tomato spotted wilt virus in tomato. Journal of Economic Entomology, 2004, **97**: 1648-58.
135. R i z o s H., G u n n L.V., P a r e s R.D., G i l l i n g s M.R.: Differentiation of Cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. Journal of General Virology, 1992, **73**: 2099-2103.
136. R o o s s i n c k M.J.: Evolutionary history of cucumber mosaic virus deduced by phylogenetic analyses. Journal of Virology, 2002, **76**: 3382-3387.
137. R o o s s i n c k M.J.: Cucumber mosaic virus, a model for RNA virus evolution. Molecular Plant Pathology, 2001, **2**: 59-63.
138. R o o s s i n c k M.J., Z h a n g L., H e l l w a l d K.H.: Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of Cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. Journal of Virology 1999, **73**: 6752-6458.

139. Roossinck M.J., Bujarski J., Ding S.W., Hajimorad R., Hanada K., Scott S., Touisnant M.: Family Bromoviridae. In: Virus Taxonomy—Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop (eds). Academic Press, San Diego, California, 1999, pp. 923-935.
140. Rotenberg D., Whitfield A.E.: Molecular interactions between tospoviruses and thrips vectors. *Current Opinion in Virology*, 2018, **33**: 191-197.
141. Rotenberg D., Krishna Kumar N.K., Ullman D.E., Montero-Astua M., Willis D.K.: Variation in Tomato spotted wilt virus titer in *Frankliniella occidentalis* and its association with frequency of transmission. *Phytopathology*, 2009, **99**: 404-10.
142. Rybicki E.P.: A Top Ten list for economically important plant viruses. *Archives of Virology*, 2015, **160**: 17-20.
143. Schnettler E., Hemmes H., Huisman R., Goldbach R., Prins M., Kormelink R.: Diverging affinity of tospovirus RNA silencing suppressor proteins, NSs, for various RNA duplex molecules. *Journal of Virology*, 2010, **84**: 11542-54.
144. Schneewis D.J., Whitfield A.E., Rotenberg D.: Thrips developmental stage-specific transcriptome response to tomato spotted wilt virus during the virus infection cycle in *Frankliniella occidentalis*, the primary vector. *Virology*, 2017, **500**: 226-237.
145. Scholthof K.B.: Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 2011, **12**: 938-954.
146. Senthil G., Liu H., Puram V.G., Clark A., Stromberg A., Goodin M.M.: Specific and common changes in *Nicotiana benthamiana* gene expression in response to infection by enveloped viruses. *Journal of General Virology*, 2005, **86**: 2615-2625.
147. Seo J.K., Kwon S.J., Choi H.S., Kim K.Y.: Evidence for alternate states of Cucumber mosaic virus replicase assembly in positive- and negative-strand RNA synthesis. *Virology*, 2009, **383**: 248-260.
148. Shi B.J., Miller J., Symons R.H., Palukaitis P.: The 2b protein of cucumoviruses has a role in promoting the cell-to-cell movement of pseudorecombinant viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, **16**: 261-267.
149. Shi B.J., Palukaitis P., Symons R.H.: Differential virulence by strains of Cucumber mosaic virus is mediated by the 2b gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, **15**: 947-955.
150. Shimura H., Pantaleo V., Ishihara T., Myojo N., Inaba J.I., Sueda K., Burgyan J., Masuta C.: A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *PLoS Pathogens* 2011, **7**: e1002021.
151. Shrestha A., Srinivasan R., Riley D.G., Culbreath A.K.: Direct and indirect effects of a thrips-transmitted Tospovirus on the preference and fitness of its vector, *Frankliniella fusca*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2012, **145**: 260-271.
152. Siddiqui S.A., Sarmiento C., Truve E., Lehto H., Lehto K.: Phenotypes and functional effects caused by various viral RNA silencing suppressors in transgenic *Nicotiana benthamiana* and *N. tabacum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008, **21(2)**: 178-187.
153. Sin S.H., McNulty B.C., Kennedy G.G., Moyer J.W.: Viral genetic determinants for thrips transmission of Tomato spotted wilt virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, **102**: 5168-5173.
154. Sivakumar K., Chen M., Roossinck M.J., Kao C.C.: Core promoter for initiation of cucumber mosaic virus subgenomic RNA4A. *Molecular Plant Pathology*, 2002, **3**: 43-52.
155. Smith N.A., Eamens A.L., Wang M.B.: Viral small interfering RNAs target host genes to mediate disease symptoms in plants. *PLoS Pathogens*, 2011, **7**: e1002022.
156. Soards A.J., Murphy A.M., Palukaitis P., Carr J.P.: Virulence and differential local and systemic spread of Cucumber mosaic virus in tobacco are affected by the CMV 2b protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, **15**: 647-653.



157. Soundararajan P., Manivannan A., Muneer S., Park Y.G., Ko C.H., Jeong B.R.: Computational analysis of tomato spotted wilt virus glycoprotein trafficking mechanism and its inhibition by antiviral agents. *Austin Journal of Proteomics, Bioinformatics & Genomics*, 2015, **2(1)**: Id1010.
158. Stevens M.R., Scott S.J., Gergerich R.C.: Inheritance of a gene for resistance to Tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica*, 1991, **59**: 9-17.
159. Stumpf C.F., Kennedy G.G.: Effects of tomato spotted wilt virus (TSWV) isolates, host plants, and temperature on survival, size, and development time of *Frankliniella fusca*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2005, **114**: 215-225.
160. Su S., Liu Z., Chen C., Zhang Y., Wang X., Zh L., Miao L., Wang X.C., Yuan M.: Cucumber mosaic virus movement protein severs actin filaments to increase the plasmodesmal size exclusion limit in tobacco. *Plant Cell*, 2010, **22**: 1373-1387.
161. Szilassy D., Salanki K., Balazs E.: Molecular evidence for the existence of two distinct subgroups in Cucumber mosaic cucumovirus. *Virus Genes*, 1999, **18**: 221-227.
162. Takeda A., Sugiyama K., Nagano H., Mori M., Kaido M., Mise K., Tsuda S., Okuno T.: Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. *FEBS Letters*, 2002, **532**: 75-79.
163. Thompson J.R., Buratti E., de Wispelaere M., Tepfer M.: Structural and functional characterization of the 50 region of subgenomic RNA5 of Cucumber mosaic virus. *Journal of General Virology*, 2008, **89**: 1729-1738.
164. Tóbiás I., Szabó B., Salanki K., Sari L., Kuhlmann H., Palkovics L.: Seedborne transmission of Zucchini yellow mosaic virus and Cucumber mosaic virus in Styrian Hulless group of Cucurbita pepo. *Cucurbitaceae 2008 Proceedings of the IXth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae*, 2008, pp. 189-197.
165. Trojka K-Goluch A., Berbeć A., Doroszevska T.: Wykorzystanie gatunków z rodzaju *Nicotiana* w najnowszej krajowej hodowli odpornościowej tytoniu. *Agronomy Science*, 2017, **72(4)**: 47-56.
166. Turina M., Kormelink R., Resende R.O.: Resistance to tospoviruses in vegetable crops: epidemiological and molecular aspects. *Annual Review of Phytopathology*, 2016, **54**: 347-371.
167. Ullman D.E., German T.L., Sherwood J.L., Westcot D.M., Cantone F.A.: Tospovirus replication in insect vector cells – immunocytochemical evidence that the nonstructural protein encoded by the s-rna of tomato spotted wilt tospovirus is present in thrips vector cells. *Phytopathology*, 1993, **83**: 456-463.
168. van de Wetering F., Goldbach R., Peters D.: Tomato spotted wilt tospovirus ingestion by first instar larvae of *Frankliniella occidentalis* is a prerequisite for transmission. *Phytopathology*, 1996, **86**: 900-905.
169. van Knippenberg I., Goldbach R., Kormelink R.: Tomato spotted wilt virus S-segment mRNAs have overlapping 3-ends containing a predicted stem-loop structure and conserved sequencemotif. *Virus Research*, 2005, **110**: 125-131.
170. van Poelwijk F., De Haan P., Kikkert M., Prins M., Kormelink R., Storms M., van Lent J., Peters D., Goldbach R.: Replication and expression of the tospoviral genome. *Acta Horticulturae*, 1996, **431**: 201-208.
171. Weng Z., Barthelson R., Gowda S., Hilf M.E., Dawson W.O., Galbraith D.W., Xiong Z.: Persistent infection and promiscuous recombination of multiple genotypes of an RNA virus within a single host generate extensive diversity. *PLoS One*, 2007, **2**: e917.
172. Whitfield A.E., Falk B.W., Rotenberg D.: Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology*, 2015, **479-480**: 278-289.
173. Whitfield A.E., Kumar N.K.K., Rotenberg D., Ullman D.E., Wyman E.A., Zietlow C., Willis D.K., German T.L.: A soluble form of the Tomato spotted wilt virus (TSWV) glycoprotein G(N) (G(N)-S) inhibits transmission of TSWV by *Frankliniella occidentalis*. *Phytopathology*, 2008, **98**: 45-50.

174. Whitfield A.E., Ullman D.E., German T.L.: Tospovirus-thrips interactions. Annual Review of Phytopathology, 2005, **43**: 459-489.
175. Whitfield A.E., Ullman D.E., German T.L.: Expression and characterization of a soluble form of Tomato spotted wilt virus glycoprotein G(N). Journal of Virology, 2004, **78**: 13197-13206.
176. Wijkamp I., Goldbach R., Peters D.: Propagation of tomato spotted wilt virus in *Frankliniella occidentalis* does neither result in pathological effects nor in transovarial passage of the virus. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1996, **81**: 285-292.
177. Wilson C.R.: Incidence of weed reservoirs and vectors of tomato spotted wilt tospovirus on southern Tasmanian lettuce farms. Plant Pathology, 1998, **47**: 171-176.
178. Wilson V., Taylor P., Desselberger U.: Crossover regions in foot-and-mouth disease virus (FMDV) recombinants corresponds to regions of high local secondary structure. Archives of Virology, 1988, **102**: 131-139.
179. Wróbel-Marek J., Kulińska-Lukaszek K., Kurczyńska E.U.: Komunikacja symplastowa i jej rola w rozwoju roślin. Postępy Biologii Komórki, 2015, **42(3)**: 573-594.
180. Wu X., Xu S., Zhao P., Zhang X., Yao X., Sun Y.: The Orthotospovirus nonstructural protein NSs suppresses plant MYC-regulated jasmonate signaling leading to enhanced vector attraction and performance. PLoS Pathogens, 2019, **15**: e1007897.
181. Yang Y., Kim K.S., Anderson E.J.: Seed transmission of Cucumber mosaic virus in spinach. Phytopathology, 1997, **87**: 924-931.
182. Yao M.: Inheritance and QTL Analysis for resistance to cucumber mosaic virus in pepper. Doctoral thesis, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 2013, p. 12-19.
183. Yasuo K.: Studies on cucumber mosaic virus. Journal of Phytopathology, 1963, **28**: 131-138.
184. Ye J., Qu J., Zhang J.F., Geng Y.F., Fang, R.X.: A critical domain of the Cucumber mosaic virus 2b protein for RNA silencing suppressor activity. FEBS Letters, 2009, **583**: 101-106.
185. Zhai Y., Bag S., Mitter N., Turina M., Pappu H.R.: Mutational analysis of two highly conserved motifs in the silencing suppressor encoded by Tomato spotted wilt virus (genus Tospovirus, family Bunyaviridae). Archives of Virology, 2014, **159**: 1499-1504.
186. Zhang X., Yuan Y.R., Pei Y., Lin S.S., Tuschl T., Patel D.J., Chua N.H.: Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. Genes & Development, 2006, **20**: 3255-3268.
187. Ziebell H., Payne T., Berry J.O., Walsh J.A., Carr J.P.: A cucumber mosaic virus mutant lacking the 2b counter-defence protein gene provides protection against wild-type strains. Journal of General Virology, 2007, **88**: 2862-2861.
188. Zitter T.A., Murphy J.F.: Cucumber mosaic. Plant Health Instructor, 2009, p. 1-6.

---

Adres do korespondencji:

dr Marcin Przybyś  
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin  
IUNG-PIB  
ul. Czartoryskich 8  
24-100 Puławy  
tel. 81 4786 930  
e-mail: Marcin.Przybys@iung.pulawy.pl

---

AUTOR  
Marcin Przybyś

ORCID  
0000-0002-6567-2954



Diana Czarnecka

*Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy  
w Puławach*

BIOLOGIA I WYSTĘPOWANIE  
*SCLEROTINIA SCLEROTIUM* (LIB.) DE BARY W UPRAWIE TYTONIU  
I CHMIELU ORAZ MOŻLIWOŚCI JEJ OGRANICZANIA\*

**Słowa kluczowe:** *Sclerotinia sclerotiorum*, tytoń, chmiel, biologia, metody ograniczania

**Wstęp**

Gatunek *Sclerotinia sclerotiorum* zaliczany jest do patogenów roślinnych o największym znaczeniu ekonomicznym, a także jest jednym z najbardziej powszechnych na świecie. Jak podaje Purdy (54), polifag ten do lat 80. XX wieku zidentyfikowany został na 383 gatunkach, natomiast w roku 2008 podawano już, że poraża ponad 400 gatunków (57). Na podstawie przeglądu literatury można wnosić, że istnieje więcej niż 60 nazw używanych do określenia chorób powodowanych na roślinach przez ten patogen (54). Wielokrotnie pojawiającym się w literaturze określeniem choroby jest biała zgnilizna (ang. *white mold*). W Polsce najczęściej spotykanymi nazwami chorób wywoływanych przez *S. sclerotiorum* jest zgnilizna twardzikowa (tab. 1), biała pleśń oraz zgorzel łodyg (61).

Tabela 1

Charakterystyka sprawcy zgnilizny twardzikowej – *S. sclerotiorum*

Kryteria	Charakterystyka
Sprawca choroby	twardnica pasożytnicza, grzyb <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary
Nazwy choroby w języku polskim	zgnilizna twardzikowa biała zgnilizna zgorzel łodygi

\*Opracowanie wykonano w ramach zadania 7.1 pt. „Opracowanie i aktualizacja Programów integrowanej ochrony roślin uprawnych w zakresie tytoniu i chmielu” z dotacji budżetowej przeznaczonej na realizację zadań MRiRW w 2022 r.

Kryteria	Charakterystyka
Nazwy choroby w języku angielskim	White Mold <i>Sclerotinia</i> Stalk Rot <i>Sclerotinia</i> disease
Systematyka	Domena: Eukarionty ( <i>Eukaryota</i> ) Królestwo: Grzyby ( <i>Fungi</i> ) Typ: Workowce ( <i>Ascomycota</i> ) Klasa: Patyczniaki ( <i>Leotiomycetes</i> ) Rząd: Tocznikowce ( <i>Helotiales</i> ) Rodzina: Twardnicowate ( <i>Sclerotiniaceae</i> ) Rodzaj: Twardnica ( <i>Sclerotinia</i> ) Gatunek: Twardnica pasożytnicza ( <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Libert) de Bary)
Warunki sprzyjające rozwojowi	wiosna – wilgotna i chłodna pogoda; lato – wilgotna i ciepła pogoda
Roślina-gospodarz	rzepak, tytoń, marchew, pietruszka, burak, ogórek, pomidor, fasola, soja, słonecznik, inne rośliny warzywne
Objawy choroby	jasnobrązowe, szare nekrozy; mokre, gnijące plamy, biała grzybnia; objawy więdnienia; formowanie czarnych sklerocji
Zwalczanie	fungicydy, biopreparaty na bazie pożytecznych grzybów lub bakterii, zabiegi agrotechniczne
Struktury przetrwalne	sklerocja

Źródło: opracowanie własne

### Historia występowania *Sclerotinia sclerotiorum*

Patogen grzybowy *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary jest szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie czynnikiem chorobotwórczym wielu gatunków roślin. Rozpoznany został dosyć wcześnie i był różnie nazywany. W 1837 r. gatunek ten został po raz pierwszy opisany przez Madame M.A. Libert, która używała nazwy *Peziza sclerotiorum* Lib. (39), do czasu gdy została ona zmieniona na *Sclerotinia libertiana* przez Fuckela (54). Natomiast od roku 1884 de Bary po raz pierwszy użył nazwy *Sclerotinia sclerotiorum* i do dnia dzisiejszego jest ona stosowana przez większość mykologów (7). Pierwsze doniesienia o występowaniu *S. sclerotiorum* dotyczyły uprawy sałaty (*Lactuca sativa*) w warunkach szklarniowych w 1890 r. w stanie Delaware w USA (69). Wówczas wyodrębniono dodatkowe gatunki na podstawie wielkości sklerocji i roślin żywicielskich: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia libertiana* oraz *Sclerotinia minor*. Jak podaje Purdy (54), wyodrębnienie izolatów grzybowych na podstawie wielkości sklerot i powiązanie ich z określonymi roślinami żywicielskimi posłużyło do wyróżnienia dodatkowych gatunków: *S. intermedia* Ramsey, *S. serica* Keay, *S. trifoliorum* Eriks. var. *fabae* Keay, *S. sativa* Drayton and Groves. Spośród wymienionych powyżej gatunków powszechnie przyjęto

trzy ważne gospodarczo gatunki: *S. minor* Jagger, *S. trifoliorum* Eriks oraz *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary (7). Gatunki te rozróżnia się na podstawie ich roślin żywicielskich. Najbardziej niespecyficznym gatunkiem jest *S. sclerotiorum* występujący zarówno w klasie nagonasiennych (*Gymnospermae*), jak i okrytonasiennych (*Angiospermae*). Natomiast *S. minor* infekuje tylko rośliny w podklasie dwuliściennych (*Dicotyledonae*) i jednoliściennych (*Monocotyledonae*) w dziale roślin nasiennych (*Spermatophyta*) w obrębie klasy *Angiospermae*, a *S. trifoliorum* ma zasięg ograniczony do roślin strączkowych, pastewnych (57).

*S. sclerotiorum* jest wszechobecnym patogenem występującym na całym świecie. Poraża 408 gatunków z 75 rodzin roślin dwuliściennych, głównie należących do rodzin: psiankowate (*Solanaceae*), krzyżowe (*Cruciferae*), selerowate (*Apiaceae*), astrowate (*Asteraceae*), komosowate (*Chenopodiaceae*) (obecnie rodzina szarłatowata – *Amaranthaceae*) i bobowate (*Fabaceae*) (6, 33, 67). W Polsce *S. sclerotiorum* poraża między innymi: rzepak, tytoń, marchew, pietruszkę, buraka, ogórka, pomidory, fasolę, soję, słonecznik, a także inne rośliny warzywne (36). Na terenie naszego kraju wysokie szkody wyrządza w uprawach rzepaku ozimego (straty plonu do 30%), a w mniejszym stopniu rzepaku jarego i tytoniu (34, 61).

Jak podaje Boland i Hall (6), tylko kilka gatunków należących do roślin jednoliściennych ulega infekcji *S. sclerotiorum*, tj.: *Avena* sp., *Secale cereale*, *Triticum aestivum*, *Sorghum vulgare*, *Setaria viridis*, *Penisetum americanum*, *Zea* sp.

### Szkodliwość *Sclerotinia sclerotiorum*

*S. sclerotiorum* jest destruktywnym patogenem grzybowym z uwagi na zdolność do infekowania roślin na każdym etapie ich rozwoju: od młodej siewki do dojrzałej rośliny wytwarzającej owoce, zarówno w polu, jak i w czasie ich przechowywania. Poza tym patogen ten może przetrwać 90% swojego życia w formie spoczynkowej w postaci sklerocji (51). Dzięki tym strukturom patogen jest w stanie przeczekać w glebie niedogodne dla swego rozwoju warunki, a także brak w otoczeniu rośliny-gospodarza, stając się w ten sposób źródłem infekcji w kolejnych latach uprawy (2, 73).

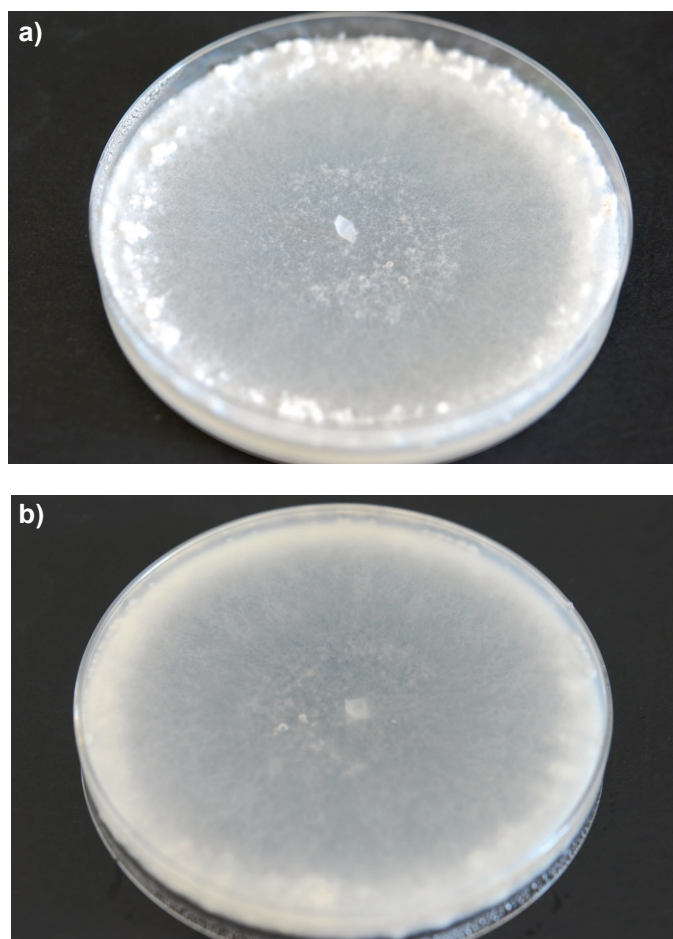
Grzyb *S. sclerotiorum* może atakować rośliny tytoniu już na etapie produkcji rozsady lub w początkowych stadiach rozwoju tytoniu w polu. Jednak głównych zniszczeń patogen ten dokonuje w drugiej połowie lata, zwłaszcza przy korzystnych dla jego rozwoju warunkach klimatycznych. Porażenie roślin następuje wówczas bardzo szybko, a dynamika rozwoju choroby prowadzić może do całkowitego zniszczenia plantacji tytoniu. Stosowana w uprawie tytoniu monokultura jest drugim czynnikiem sprzyjającym rozwojowi choroby. Należy pamiętać o tym, że rokroczne nagromadzenie w glebie czynnika infekcyjnego w postaci sklerocji stwarza wysokie ryzyko dla uprawy tytoniu i wystąpienia choroby na plantacji (5).

Szkodliwość *S. sclerotiorum* w uprawie chmielu jest równie wysoka jak w przypadku innych upraw rolniczych i może prowadzić do stopniowego wyniszczenia roślin chmielu na plantacji. Należy pamiętać o tym, iż rośliny chmielu rosną na plantacji przez kilkanaście lat. Stąd bardzo ważna jest zdrowotność materiału nasadzeniowego, a także stanowisko pod uprawę. *S. sclerotiorum* jest patogenem grzybowym pozostającym w glebie w postaci sklerocji kilka lat. Należy zatem wystrzegać się zakładania plantacji chmielu na glebach, gdzie uprawiany był wcześniej rzepak, tytoń, słonecznik, czy inna roślina będąca gospodarzem *S. sclerotiorum*.

### Morfologia grzyba

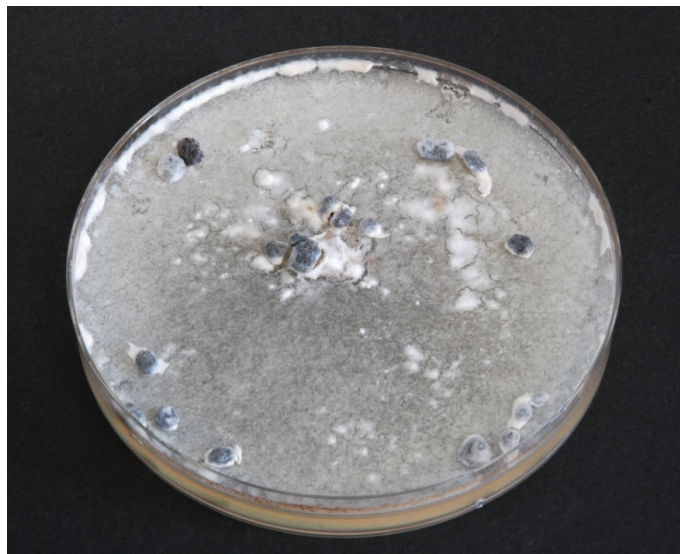
Wzrost kolonii *S. sclerotiorum* jest bardzo szybki na pożywce PDA (ang. *Potato Dextrose Agar*), gdyż już po 4-dniowej inkubacji w temperaturze 24°C kolonia osiąga średnicę 4–8 cm, a po 6–8 dniach grzybnia przerasta niemal całą szalkę Petriego (rys. 1). Optymalna dla wzrostu kolonii jest temperatura w zakresie 15–25°C i pH podłoża 4–5,5. Na ogół grzybnia jest puszysta i biała (czasem hialinowa – przezroczysta), ale zdarzają się izolaty w odcieniu szarawym bądź kremowym. Strzępki grzybni są wielojądrowe i rozgałęziające się (7). Po dłuższej hodowli (2–3 tygodnie), a czasem po 5 dniach na obrzeżach szalki tworzą się ciemne przetrwalniki – sklerocja (rys. 2 i 3). Sklerocjum jest skupiskiem strzępek, które w swej zewnętrznej warstwie zawierają melaninę, stąd czarna barwa struktur. Jak podaje literatura, u niektórych patogenów melanina odgrywa kluczową rolę w ochronie przed niekorzystnymi warunkami środowiska, a także przed rozkładem przez mikroorganizmy (4, 25) bądź wpływa na stopień wirulencji (63). Jednak w przypadku *S. sclerotiorum* zależności pomiędzy patogennością a melaniną nie stwierdzono (57). Skleroty mogą być owalne, kuliste bądź wydłużone z ostrymi końcami. Ich średnica wynosi 2–12 mm (1), a rozmiary i kształty mogą różnić się w zależności od rośliny-gospodarza. Na przykład na słoneczniku sklerocjum okrywające warstwę nasion może mieć grubość 1 cm i osiągać średnicę 35 cm, podczas gdy na fasoli suchej sklerocja mają kształt kulisty i 2–10 mm średnicy (7). Wewnętrzna część sklerocjum – medulla, jest osadzona we włóknistej macierzy składającej się z węglowodanów (głównie  $\beta$ -glukanów) i białek (38). Scharakteryzowano 3 etapy rozwoju sklerocjum (64). Pierwszy to inicjacja, w której następuje agregacja grzybni i utworzenie białej masy zwanej zaczątkami sklerocyjnymi (ang. *sclerotial initial*). W drugim etapie odbywa się wzrost grzybni i jej dalsza agregacja, czyli zwiększenie rozmiaru sklerocjum. Z kolei trzeci etap to dojrzewanie sklerocjum polegające na rozgraniczeniu warstwy zewnętrznej, odkładaniu melaniny w komórkach peryferyjnych i wzmocnieniu wewnętrznym. Według Christiasa i Lockwooda (10) sklerocja są wytwarzane po tym, jak wzrost grzybni napotyka na środowisko o ograniczonej zawartości składników odżywczych. Wykazano również, że pH pożywki w warunkach laboratoryjnych wpływa na rozwój sklerocji. Przy odczynie zasadowym lub neutralnym podłoża hodowlanego spada zdolność ich

wytwarzania (55). Ponadto neutralne i zasadowe pH zwiększa kumulację silnej mykotoksyny wytwarzanej przez *S. sclerotiorum* jaką jest kwas szczawiowy. Na podstawie zdolności do wytwarzania kwasu szczawiowego, szybkości przerastania i opanowywania rośliny-gospodarza, zdolności do tworzenia apotecjów oraz polimorfizmu DNA wyróżniono patotypy *S. sclerotiorum* (60). Nie wykazano zależności pomiędzy patogennością a zabarwieniem kolonii czy tempem jej wzrostu (21). Stwierdzono, iż oprócz wartości pH wpływ na formowanie sklerocji mają, między innymi: temperatura, światło, dostępność składników odżywczych oraz potencjał osmotyczny (57). Struktury te odgrywają kluczową rolę w cyklu chorobowym, ponieważ wytwarzają inokulum i są podstawowymi strukturami przetrwania długoterminowego (67), zachowującymi żywotność do 8 lat w glebie (1, 7).



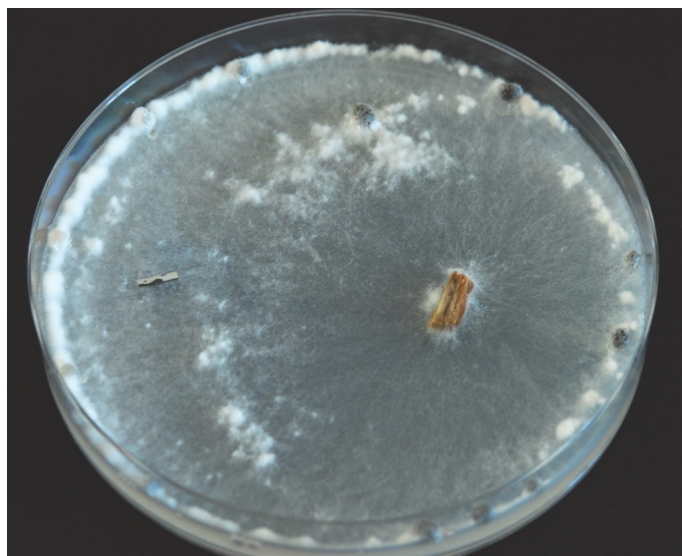
Rys.1. Sześciodniowa kultura *S. sclerotiorum* na podłożu  $\frac{1}{2}$  PDA; a – awers szalki, b – rewers szalki  
Źródło: D. Czarnicka





Rys. 2. Dwudziestodniowa kultura *S. sclerotiorum* na pożywce ½ PDA.  
Na zdjęciu widoczne czarne sklerocja

Źródło: D. Czarnecka



Rys. 3. Kolonia *S. sclerotiorum* na podłożu ½ PDA po 6 dniach od wyłożenia fragmentu pędu chmielu  
z objawami infekcji

Źródło: D. Czarnecka

Wśród czynników negatywnie wpływających na przeżywalność sklerocji wymienia się głębokość ich zakopania w glebie, całkowite zalanie (podtopienie) wodą czy wysokie temperatury (12, 18, 43, 49, 70). Zatopione w wodzie sklerocja rozpadają się całkowicie w ciągu 14–45 dni (43, 49). Do podobnych wniosków doszli Cosic i in. (12), którzy wykazali, że w przypadku ciągłej powodzi sklerocja zakopane w glebie na głębokości 5 cm ulegają całkowitej degradacji. Jednakże istnieje wiele sprzecznych doniesień na temat wpływu głębokości profilu glebowego na przeżywalność sklerocji. Struktury te umieszczone w glebie głębiej (10–13 cm) pozostają dłużej żywe niż te z górnej warstwy gleby (5 cm) (12). Do odmiennych wniosków doszli Duncan i in. (18), wykazując, iż żywotność sklerocji malała wraz z głębokością. Zjawisko to występowało niezależnie od terminu pobierania próbek w sezonie wegetacyjnym.

*S. sclerotiorum* nie posiada stadium konidialnego. Jednak, jak podaje Kochman (32), na strzępkach lub pomiędzy workami na osobnych krótkich strzępkach grzybni mogą powstawać w łańcuszkach mikrokonidia. Powstają one na płasko zakończonych fialidach. Obserwuje się je bardzo rzadko, zazwyczaj po długim czasie hodowli na podłożu wyczerpanym ze składników odżywczych (16). Mikrozarodniki nie biorą udziału w infekcji ani w rozprzestrzenianiu się choroby, nie kiełkują, a ich znaczenie w biologii grzyba jest nieznane (7).

### Cykl rozwojowy twardnicy pasożytniczej (*S. sclerotiorum*)

Patogen *S. sclerotiorum* jest zdolny do reprodukcji z udziałem sklerot w sposób bezpłciowy (myceliogeniczne kiełkowanie sklerocji) oraz w sposób płciowy (karpogeniczne kiełkowanie sklerocji) (3). Na porażonych roślinach patogen wytwarza białą, puszystą grzybnię, natomiast po kilku dniach produkowane są sklerocja.

Kiełkowanie karpogeniczne sklerocji odbywa się poprzez produkcję małych (5–10 mm średnicy), brązowych, miseczkowatych struktur zwanych apotecjami, które zawierają zarodniki płciowe – askospory (67). *S. sclerotiorum* uważany jest za patogen rozwijający się w środowisku glebowym (ang. *soilborne*), ale infekcja w większości przypadków następuje poprzez askospory unoszone przez wiatr (ang. *airborne*) (59). Procesowi kiełkowania sklerocji oraz wytwarzaniu askospór sprzyja wilgotna, chłodna gleba i temperatura powietrza pomiędzy 4–18°C. Jednakże wymagania temperaturowe są różne w zależności od pochodzenia izolatów *Sclerotinia* (11, 52, 72). Clarkson i in. (11) wykazali, że skleroty kondycjonowane w chłodzie, umieszczone w górnej warstwie gleby produkują apotecja po 2–6 tygodniach w temperaturze 15°C. Apotecja pękają i uwalniają tysiące askospor, które są z wiatrem przenoszone w obrębie łąnu na rośliny sąsiednie, a także na odległy obszar. Askospory wymagają określonych warunków środowiskowych do wykiełkowania i zainfekowania roślin. Jak podają dane literaturowe, do wykiełkowania askospor odpowiednie są temperatura w zakresie 15–25°C i wysoka wilgotność, występujące przez więcej niż 48 godzin (11, 14,

66, 72). Wrażliwe tkanki roślinne, takie jak płatki kwiatów lub starzejące się liście, porażane są jako pierwsze i stanowią źródło składników odżywczych dla rozwijającej się grzybni *Sclerotinia*, która rozrastając się, infekuje inne tkanki roślinne (40). W rzepaku dominującym źródłem infekcji są zainfekowane starzejące się płatki kwiatów, które spadają i osadzają się na osiach liści lub gałęziach łądyg (14, 62).

Do infekcji roślin może dochodzić również poprzez myceliogeniczne kiełkowanie przetrwalników (sklerocji) znajdujących się na tkankach roślin lub poprzez bezpośredni kontakt strzępek grzybni z innymi chorymi roślinami. Jednak według Link i Johnson (40) ten sposób infekcji jest stosunkowo rzadki u innych gatunków: *S. sclerotiorum* i *S. trifoliorum*. Zbadano, iż kluczowym czynnikiem sprzyjającym kiełkowaniu grzybni jest wilgoć i ekstremalne temperatury (37).

W wyniku infekcji *S. sclerotiorum* do tkanek rośliny jest wydzielany kwas szczawiowy, który poprzez zakwaszenie i tłumienie reakcji obronnych gospodarza odgrywa znaczącą rolę w patogenezie (59, 68). Wykazano, że mutanty *S. sclerotiorum* niezdolne do produkcji kwasu szczawiowego nie wytwarzały sklerocji oraz były niepatogeniczne dla roślin (23). W ostatnich badaniach stwierdzono, że to nie kwas szczawiowy jest niezbędny do wywołania choroby, ale raczej jego kwaśny odczyn (71). Denton-Giles i in. (15) badali patogeniczność różnych izolatów *Sclerotinia* w rzepaku i zaobserwowali związek pomiędzy agresywnością patogenu a jego zdolnością do zakwaszania swojego środowiska. Wydaje się, iż ta zdolność do wyczuwania i zmiany pH w swoim otoczeniu umożliwia mu przetrwanie w różnych warunkach oraz czyni go jednym z najbardziej skutecznych patogenów roślin (51).

### **Rozwój choroby i typowe objawy na roślinach tytoniu**

*S. sclerotiorum* może infekować tytoń już w fazie siewki i wówczas młode rośliny w rozsadzie pokrywa biaława grzybnia, a w konsekwencji siewki gniją i obumierają. Na plantacjach tytoniowych nasilenie zgnilizny twardzikowej obserwować można w drugiej połowie lata, kiedy to w sprzyjających rozwojowi choroby warunkach cieplej i wilgotnej pogody, porażenie tytoniu następuje dość szybko. W rozprzestrzenianiu infekcji *S. sclerotiorum* na plantacji sprzyja również okres zbiorów liści tytoniu. Grzyb wnika do tkanek rośliny poprzez rany powstałe podczas zrywania liści bądź w momencie wykonywania zabiegu pasynkowania. Objawy chorobowe widoczne są wówczas najczęściej na łądydze tytoniu. Szarobrunatne zmiany chorobowe rozszerzają się ku górze, obejmując znaczną część łądygi. Na łądydze tytoniu widoczne są ślady białej grzybni, a także formujące się sklerocja (rys. 4). Porażona łądyga brunatnieje i gnije. Infekcja przedostaje się do tkanek rdzenia łądygi, na skutek czego jej wnętrze staje się początkowo wodniste, po pewnym czasie pleśnieje i wysycha, a na końcu wypełnia się watowatą grzybnią i sklerocjami (rys. 5 i 6). Porażone rośliny więdną,

a w konsekwencji zasychają. Sklerocja mogą powstawać wewnątrz porażonej łodygi, a także na jej zewnętrznej stronie. Patogen poraża również liście i torebki nasienne (17).



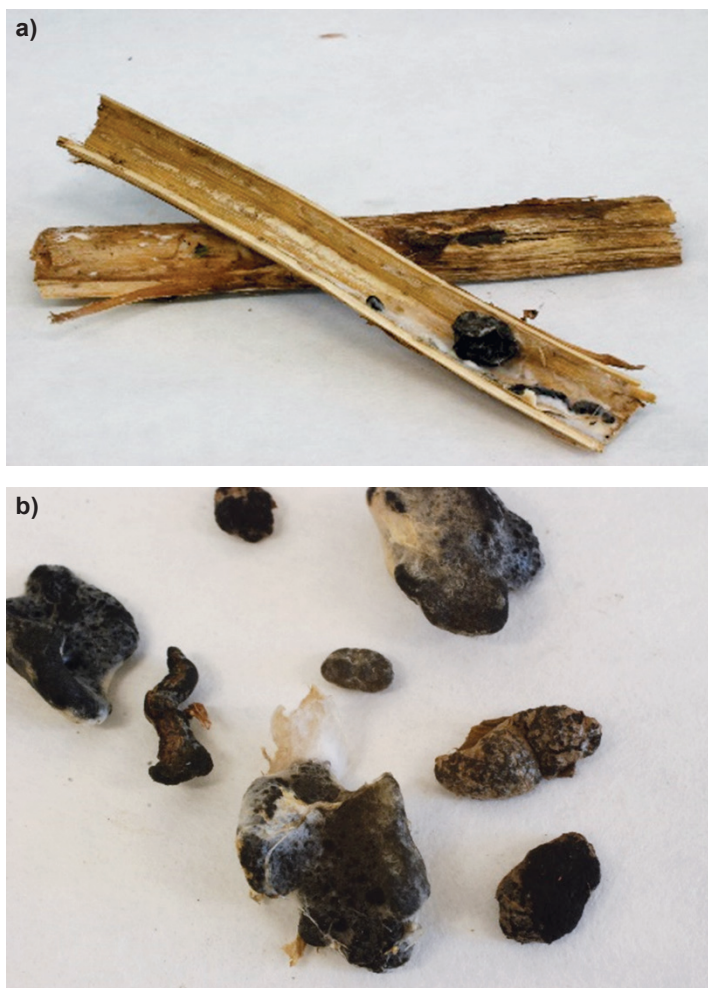
Rys. 4. Zmiany chorobowe zgnilizny twardzikowej na łodydze tytoniu, widoczna postępująca ku górze pędu nekroza, a także ślady białawej grzybni i czarne sklerocja

Źródło: D. Czarnecka



Rys. 5. Wnętrze łodygi tytoniu z objawami gnicia na skutek infekcji *S. sclerotiorum*

Źródło: D. Czarnecka



Rys. 6. Wyschnięte wnętrze łodygi tytoniu porażonej *S. sclerotiorum* (a) oraz zróżnicowane formy brunatno-czarnych sklerocji (b)

Źródło: D. Czarnecka

### **Rozwój choroby i typowe objawy na roślinach chmielu**

Patogen ten rzadko powoduje choroby na plantacjach chmielu (35, 42). W Polsce po raz pierwszy stwierdzono występowanie zgnilizny twardzikowej na roślinach chmielu w czerwcu 2021 r. na plantacji obsadzonej odmianami Lubelski oraz Magnum, zlokalizowanej w województwie lubelskim (Skomra 2021, dane niepublikowane). Porażenie roślin chmielu zwykle występuje późną wiosną w warunkach chłodnej

i wilgotnej pogody. Choroba rozwija się na pędach, w części położonej blisko powierzchni gleby lub tuż pod powierzchnią, a niekiedy objawy mogą występować również w wyższych częściach pędów (1–2 m) lub na liściach (35). Porażone pędy i liście więdną, a następnie zasychają (rys. 7). Infekcji *S. sclerotiorum* na chmielu sprzyja uszkodzenie tkanek, np. podczas obsypywania glebą dolnych części pędów (42). Na porażonych pędach pojawia się mokra zgnilizna ze śladami białej grzybni (rys. 8), z której rozwijają się skleroty o nieregularnym kształcie i zróżnicowanej wielkości (5–25 mm × 2–7 mm) (rys. 9). Duże nasilenie choroby może prowadzić do znacznych strat w uprawie chmielu (42).



Rys. 7. Porażone *S. sclerotiorum* pędy i liście chmielu więdną, a następnie zasychają  
Źródło: U. Skomra



Rys. 8. Porażone przez *S. sclerotiorum* pędy chmielu na plantacji.

Na pędach widoczna biała grzybnia w miejscach infekcji oraz czarne sklerocja (czerwone strzałki)

Źródło: U. Skomra



Rys. 9. Sklerocjum – struktura przetrwalna *S. sclerotiorum*

Źródło: U. Skomra



## Metody zwalczania zgnilizny twardzikowej

W przypadku chorób powodowanych przez *S. sclerotiorum*, tak jak i w innych chorobach grzybowych, nie ma pojedynczej metody pozwalającej skutecznie kontrolować rozprzestrzenianie się zgnilizny twardzikowej. Wśród stosowanych metod ochrony wymienia się zabiegi agrotechniczne, selekcje uprawianych odmian pod względem odporności, a także ochronę chemiczną i biologiczną (52).

Wśród zabiegów agrotechnicznych stosowanych w ograniczaniu choroby znajdują się: odpowiedni płodozmian, płużny system uprawy, dobór odpornych odmian do uprawy, unikanie zagęszczania ładu, a także zraszania. Badania nad płodozmiannem wykazały niespójne i sprzeczne wyniki. Stwierdzono, że płodozmian trwający od 2 do 4 lat zmniejsza nasilenie zgnilizny twardzikowej soi poprzez zmniejszenie liczby sklerocji w glebie (24, 48, 56). Natomiast wcześniejsze badania, prowadzone w 1978 r. przez Schwartz i Steadman (58), wykazały, iż 3-letni płodozmian nie zmniejszył znacząco populacji sklerocji. Ze względu na długotrwałą zdolność przeżywania sklerocji zalecane jest poznanie historii upraw stosowanych na danym polu w celu określenia poziomu inokulum w glebie. Z uwagi na szeroki zakres żywicieli *S. sclerotiorum* i wysoką zdolność do przetrwania w niekorzystnych warunkach, płodozmian nie jest skutecznym środkiem kontroli, ale może obniżyć poziom inokulum w glebie. Zabiegi uprawowe również mogą wpływać na zawartość inokulum, jakim są sklerocja w glebie. Istnieją jednak sprzeczne informacje, gdyż, jak podaje Mueller i in. (50), płytkie bronowanie utrzymuje porażone ściernisko na powierzchni gleby lub w jej pobliżu, zwiększając korzystne warunki do karpogenicznego kiełkowania sklerocji. Jednakże wcześniejsze badania prowadzone przez Gracia-Garza i in. (24) wykazały, że liczba apotecji, czyli pierwotnego inokulum była zmniejszona na polach soi uprawianych bez orki. Z kolei Brustolin i in. (8) stwierdzili, że sklerocja pozostawione na powierzchni gleby na polu soi, straciły żywotność po 12 miesiącach. W przypadku, gdy gleba porażona przez *S. sclerotiorum* jest głęboko zaorana, to sklerocja w niej zakopane mają szansę przeżyć znacznie dłużej. Tak więc podobnie jak w przypadku płodozmiannu uprawa orkowa lub zerowa dawały sprzeczne wyniki, co związane może być z rodzajem ścierniska, właściwością gleby, występowaniem materii organicznej czy też innym zmiennym czynnikiem środowiskowym.

Skutecznym i bardzo powszechnym sposobem tłumienia lub zwalczania zgnilizny twardzikowej jest chemiczna ochrona upraw z udziałem fungicydów. Jednakże należy mieć na uwadze fakt, że żaden fungicyd nie zapewnia pełnej kontroli przed chorobami grzybowymi. Hamowanie infekcji powodowanej przez *S. sclerotiorum* poprzez stosowanie środków grzybobójczych zachodzi w sposób zróżnicowany i jest zależne od zastosowanego rodzaju fungicydu (52). Podstawowymi czynnikami decydującymi o skuteczności zabiegu, oprócz terminu wykonania oprysku, który uzależniony jest od fazy rozwojowej patogenu, są: metoda aplikacji, substancja czynna fungicydu oraz stopień pokrycia i penetracji preparatu w głąb ładu. W niektórych uprawach aplikacja fungicydu jest dość trudna z uwagi na gęstość ładu czy pokrój rośliny-gospodarza.

Ponadto stosowanie chemicznych środków ochrony roślin w niektórych uprawach wiąże się ze zwiększeniem nakładów produkcji i nie ma ekonomicznego uzasadnienia. Należy pamiętać, że fungicydy są szkodliwe dla środowiska jak i dla pożytecznych mikroorganizmów. Z uwagi na to biologiczne formy ochrony z udziałem organizmów pożytecznych stają się alternatywą dla takich upraw i są bardziej ekologiczne oraz wpisują się w intergowaną ochronę roślin (13, 57).

### Biologiczne metody ochrony roślin przed *S. sclerotiorum*

Na aktywność organizmów pożytecznych w glebie wpływa wiele abiotycznych i biotycznych czynników środowiskowych, takich jak np.: temperatura, potencjał wodny, odczyn gleby, zawartość pestycydów, materii organicznej, mikroorganizmów glebowych, gatunek rośliny, co sprawia, że ich stosowanie może być mniej efektywne niż pestycydów (59). Jednakże metody biologicznej walki z chorobami roślin są mniej szkodliwe dla środowiska i budzą coraz większe zainteresowanie wśród badaczy i rolników.

W ostatnich latach w wielu pracach poświęca się dużo uwagi biologicznym czynnikom zwalczającym (BCA, ang. *Biological Control Agents*), które mogą stanowić alternatywę w kontroli nasilenia zgnilizny twardzikowej, poprzez hamowanie kiełkowania sklerocji i atakowanie strzępek patogenu przy użyciu pasożytniczych czy antagonistycznych mikroorganizmów (28, 44, 53). Antagonistyczne bakterie i grzyby mogą być wykorzystywane do zwalczania, czy też ograniczania infekcji powodowanej przez *S. sclerotiorum* (29, 51, 59). Wiele grzybów wykazało aktywność mykopasożytniczą lub antagonistyczną wobec *S. sclerotiorum* (59).

Szczególne uwagę badaczy skupił grzyb *Coniothyrium minitans* (26, 45, 47, 65, 76). Na bazie szczepu *C. minitans* (CON/M/91-08) został opracowany preparat handlowy o nazwie Contans®WG, który skutecznie ogranicza szkody powodowane przez *S. sclerotiorum* w wielu uprawach poprzez infekowanie i degradację sklerocjów (46). Zeng i in. (76) wykazali, że aplikacja *C. minitans* w wierzchnią warstwę gleby przed sadzeniem soi zmniejszyła wskaźnik nasilenia choroby (DSI, ang. *disease severity index*) o 68% i liczbę sklerocji w glebie o 95,3%. Bezpośrednia penetracja sklerocji oraz ich rozpad możliwy jest dzięki dużej liczbie produkowanych enzymów rozkładających ściany komórkowe oraz wtórnych metabolitów, wytwarzanych przez *C. minitans*. Wzmocniona aktywność *C. minitans* możliwa była w optymalnych dla niego warunkach – 15–20°C i pH w zakresie 4,5–5,6 (76). Jednakże, aby *C. minitans* przetrwał i pasożytował, wymaga ciągłej obecności sklerocjów w glebie (19).

Grzyby z rodzaju *Trichoderma* są kolejnym przykładem mikroorganizmów wykorzystywanych do ograniczenia infekcji powodowanych przez *S. sclerotiorum* (77). Gatunki te z uwagi na szybkie tempo wzrostu oraz obfitą produkcję zarodników są wysoce konkurencyjne w stosunku innych mikroorganizmów glebowych. W przypadku aktywności przeciwgrzybiczej wobec *S. sclerotiorum* właściwości mykopasożytnicze *Trichoderma* odgrywają ważną rolę. Chitynazy, glukanazy, proteazy i celulazy zostały

zidentyfikowane wśród enzymów *Trichoderma*, które rozkładają ścianę komórkową patogenów (9, 30, 41, 75). Zhang i in. (77) wykazali, że izolat *T. harzianum* (T-aloe) hamował wzrost strzępek *S. sclerotiorum* w 56,3%. W badaniach tych stwierdzono również, że *Trichoderma* spp. nie tylko ogranicza wzrost grzybów chorobotwórczych, ale też poprawia zdrowotność roślin poprzez wzrost zawartości chlorofilu i fenolu w roślinach. Z kolei Geraldine i in. (22) obserwowali zmniejszenie liczby apotecji *S. sclerotinia*, a tym samym nasilenia choroby po zastosowaniu *T. asperellum* w dwuletnich doświadczeniach polowych z fasolą zwyczajną. Zaobserwowali oni również pozytywny wpływ aplikacji zarodników *T. asperellum* w postaci zwiększenia liczby strąków na roślinie oraz wzrost plonu o 40% w porównaniu z obiektem kontrolnym. Jednakże liczba doniesień o antagonistycznych zdolnościach grzybów z rodzaju *Trichoderma* w stosunku do *S. sclerotiorum* prowadzonych w warunkach polowych jest ograniczona (22, 31, 76).

*Bacillus amyloliquefaciens* i *Pseudomonas chlororaphis* mogą być stosowane jako bakteryjne czynniki biokontrolne do zwalczania *S. sclerotiorum* (20). Bakterie te zahamowują zarówno kiełkowanie karpogeniczne, jak i myceliogeniczne sklerocji poprzez produkcję substancji przeciwdrobnoustrojowych. Te dwie bakterie hamowały infekcję *S. sclerotiorum* na polu rzepaku. Yuen i in. (74) stwierdzili, że rośliny fasoli jadalnej, w kontrolowanych warunkach środowiskowych, traktowane wstępnie *Erwinia herbicola* miały mniejszą zgniliznę łądogową niż rośliny kontrolne (74). Jednakże *E. herbicola* nie była skuteczna w ograniczaniu *Sclerotinia* w warunkach polowych.

Pośrednio metoda biologiczna może być zastosowana w celu ochrony upraw narażonych na infekcję *S. sclerotiorum* przez wzbogacenie życia mikrobiologicznego za pomocą nawożenia organicznego. W nawozach organicznych znajdują się liczne grzyby, bakterie i promieniowce. Wśród nich spotykane są też organizmy mające zdolność niszczenia patogenów powodujących choroby, na przykład grzyby z rodzaju *Trichoderma*, a także bakterie z rodzaju *Bacillus* (27).

## Podsumowanie

Uprawa roślin narażonych na choroby powodowane przez *S. sclerotiorum*, szczególnie rzepaku, marchwi, słonecznika, tytoniu, fasoli, sałaty, soi, powoduje nagromadzenie inokulum w postaci sklerot w glebie, co może prowadzić do zwiększenia strat w plonie. Do całkowitej redukcji populacji *Sclerotinia* metody biologiczne nie wydają się być wystarczające. Metoda ta sprawdza się wówczas, gdy nagromadzenie inokulum w glebie nie jest wysokie. Wówczas zasadne wydaje się być zastosowanie organizmów antagonistycznych, o silnych właściwościach pasożytniczych, takich jak *C. minitans* lub grzybów z rodzaju *Trichoderma* spp. W celu ograniczenia chorób powodowanych przez grzyby z rodzaju *Sclerotinia* najbardziej korzystne jest połączenie metod chemicznej i biologicznej, a także stosowanie odmian odpornych i rotacji upraw (59).

## Literatura

1. Adams P.B., Ayers W.A. Ecology of *Sclerotinia species*. *Phytopathology*, 1979, **69**: 899-904.
2. Agrios G.N.: Chapter Eleven – Plant diseases caused by fungi. In: *Plant Pathology*, G.N. Agrios (ed.). Fifth ed. Academic Press, San Diego, 2005, pp. 385-614.
3. Aldrich-Wolfe L., Travers S., Nelson B.D. Jr.: Genetic variation of *Sclerotinia sclerotiorum* from multiple crops in the North Central United States. *PLoS One*, 2015, pp. 1-18. doi:10.1371/journal.pone.0139188
4. Bell A.A., Wheeler M.H.: Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology*, 1986, **24**: 411-451.
5. Berbé A.: *Agrotechnika mieszańcowych upraw tytoniu Virginia*. Puławy, 2011.
6. Bollan G.J., Hall R.: Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1994, **16(2)**: 93-108.
7. Bolton M.D., Thomma B.P., Nelson B.D.: *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 2006, **7(1)**: 1-16.
8. Brustolin R., Reis E.M., Pedron L.: Longevity of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia on the soil surface under field conditions. *Summa Phytopathologica*, 2016, **42**: 172-174.
9. Chet I., Benhamou N., Haran S.: Mycoparasitism and lytic enzymes. In: *Trichoderma and gliocladium*, G.E. Harman, C.P. Kubicek (eds). Taylor & Francis, Ltd., London 1998, **2**: 153-169.
10. Christians C., Lockwood J.L.: Conversion of mycelial constituents in four sclerotium-forming fungi in nutrient deprived conditions. *Phytopathology*, 1973, **63**: 602-605.
11. Clarkson J.P., Fawcett L., Anthony S.G., Young C.A.: Model for *Sclerotinia sclerotiorum* infection and disease development in lettuce, based on the effects of temperature, relative humidity and ascospore density. *PLoS One*, 2014, **9**: e94049. doi: 10.1371/journal.pone.0094049.
12. Cosic J., Jurkovic D., Vrandecic K., Kaucic D.: Survival of buried *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia in undisturbed soil. *Helia*, 2012, **35**: 73-78.
13. Davidson A.L., Blahut-Beatty L., Itaya A., Zhang Y., Zheng S., Simmonds D.: Histopathology of *Sclerotinia sclerotiorum* infection and Oxalic Acid function in susceptible and resistant soybean. *Plant Pathology*, 2016, **65**: 878-887.
14. Derbyshire M.C., Denton-Giles M.: The control of *Sclerotinia* stem rot on oilseed rape (*Brassica napus*): current practices and future opportunities. *Plant Pathology*, 2016, **65**: 859-877.
15. Denton-Giles M., Derbyshire M.C., Khentry Y., Buchwaldt L., Kamphuis L.G.: Partial stem resistance in *Brassica napus* to highly aggressive and genetically diverse *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Australia. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2018, **40**: 551-561.
16. Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. (eds): *Compendium of soil fungi*, Vol 1. IHW-Verlag, Eching, 1993, pp. 712-716.
17. Doroszevska T., Berbé A., Czarnecka D., Kawka M.: *Choroby i szkodniki tytoniu/ Diseases and Pests of Tobacco*. IUBG-PIB, Puławy, 2013, pp. 222.
18. Duncan R.W., Fernando W.G.D., Rashid K.Y.: Time and burial depth influencing the viability and bacterial colonization of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, **38**: 275-289.
19. Elsheshawi M., Elkhaky M.T., Sayed S.R., Bahkali A.H., Mohammed A.A., Gambhir D., Mansour A.S., Elgorban A.M.: Integrated control of white rot disease on beans caused by *Sclerotinia sclerotiorum* using Contans® and reduced fungicides application. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2017, **24**: 405-409.
20. Fernando W.G.D., Nakkeeran S., Zhang Y.: Eco-friendly methods in combating *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Recent Research in Developmental and Environmental Biology*, 2004, **1**: 329-347.
21. Garg H., Atri C., Sandhu P.S., Kaur B., Renton B., Banga S.K., et al.: High level of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in introgression lines derived from hybridization between wild crucifers and the crop *Brassica species B. napus* and *B. juncea*. *Field Crops Research*, 2010, **117**: 51-58.

22. Geraldine A.M., Lopes F.A.C., Carvalho D.D.C., Barbosa E.T., Rodrigues A.F., Brandao R.S., Ulhoa C.J., Junior M.L.: Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. *Biological Control*, 2013, **67**: 308-316.
23. Godoy G., Steadman J.R., Dickman M.B., Dam R.: Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1990, **37**: 179-191.
24. Gracia-Garza J.A., Neumann S., Vyn T.J., Boland G.J.: Influence of crop rotation and tillage on production of apothecia by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Phytopathology*, 2002, **24**: 137-143.
25. Henson J.M., Butler M.J., Day A.W.: The dark side of mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 1999, **37**: 447-471.
26. Huang H., Hoes J.A.: Penetration and infection of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans*. *Canadian Journal of Botany*, 1976, **54**: 406-410.
27. Jajor E., Strażyński P., Mrowczyński M. (red.): *Metodyka integrowanej ochrony słonecznika dla doradców*. Poznań 2020, ss. 160.
28. Kamal M.M., Lindbeck K.D., Savocchia S., Ash G.J.: Biological control of *Sclerotinia* stem rot of canola using antagonistic bacteria. *Plant Pathology*, 2015, **64**: 1375-1384.
29. Kamal M.M., Savocchia S., Lindbeck K.D., Ash G.J.: Biology and biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in oilseed *Brassicacae*. *Australasian Plant Pathology*, 2016, **45**: 1-14.
30. Kaur J., Munshi G.D., Singh R.S., Koch E.: Effect of carbon source on production of lytic enzymes by the sclerotial parasites *Trichoderma atroviride* and *Coniothyrium minitans*. *Journal of Phytopathology*, 2005, **153**: 274-279.
31. Knudsen G.R., Eschen D.J., Dandurand L.M., Bin L.: Potential for biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* through colonization of sclerotia by *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* 1991, **75**: 466-470.
32. Kochman J.: *Fitopatologia*. PWRiL, Warszawa, 1973, ss. 691.
33. Kohlenstein M.: A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. *Mycotaxon*, 1979, **9**: 365-444.
34. Korbas M., Czubiński T., Horoszkiewicz-Janka J., Jajor E., Danielewicz J.: *Atlas chorób roślin rolniczych dla praktyków*. Polskie Wydawnictwo Rolnicze Sp. z o.o., Poznań 2015, wydanie I, Top Agrar, s. 234-236.
35. Kropf S.M., Putman M.L., Serdani M., Twomey M.C.: *Sclerotinia* Wilt of Hop (*Humulus lupulus*) Caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in the Pacific Northwest United States. *Plant Disease*, 2012, **96**: 1-583.
36. Kryczyński S., Majewski T., Marcinkowska J., Mirzwa-Mróz E., Nowicki B., Paduch-Cichal E., Schollenberger M., Szyneł S., Wakuliński W., Zamorski C.: *Plant diseases in agricultural crops*. (in Polish) *Choroby roślin w uprawach rolniczych*. Ed. SGGW Warszawa, 2002, p. 54-68.
37. Lane D., Denton-Giles M., Derbyshire M., Kamphuis L.G.: Abiotic conditions governing the myceliogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* allowing the basal infection of *Brassica napus*. *Australasian Plant Pathology*, 2019, **48**: 85-91.
38. LeTourneau D.: Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. *Phytopathology*, 1979, **69**: 887-890.
39. Libert M.A.: *Plantae Cryptogamiae, quas in Arduenna collegit*. Fasc. 4, 1837, p. 301-400.
40. Link V.H., Johnson K.B.: *White mold (Sclerotinia)*. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society, 2007. <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalasco/pdlessons/Pages/WhiteMold.aspx>
41. Lopez-Mondejar R., Ros M., Pascual J.A.: Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficiency as biological control agents. *Biological Control*, 2011, **56**: 59-66.

42. Mahaffee W.F., Pethybridge S.J., Gent D.H.: Compendium of hop diseases and pests. APS Press, 2009, USA, p. 32-33.
43. Matheron M.E., Porchas M.: Influence of soil temperature and moisture on eruptive germination and viability of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease, 2005, **89**: 50-54.
44. McLaren D.L., Huang H.C., Rimmer S.R.: Control of apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans* and *Talaromyces flavus*. Plant Disease, 1996, **80**: 1373-1378.
45. McQuilken M.: Control of *Sclerotinia* disease on carrots. In. HDC Factsheet, 2011, 19/11.
46. McQuilken M.P., Chalton D.: Potential of biocontrol of sclerotinia rot of carrot with foliar sprayers of Contans WG (*Coniothyrium minitans*). Biocontrol Science and Technology, 2009, **19**: 229-235.
47. McQuilken M.P., Mitchell S.J., Budge S.P., Whipps J.M., Fenlon J.S., Archer S.A.: Effect of *Coniothyrium minitans* on sclerotial survival and apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum* in field-grown oilseed rape, Plant Pathology, 1995, **44**: 883-896.
48. Miklas P.N., Porter L.D., Kelly J.D., Myers J.R.: Characterization of white mold disease avoidance in common bean. European Journal of Plant Pathology, 2013, **135**: 525-543.
49. Moore W.D.: Flooding as a means of destroying the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathology, 1949, **39**: 920-927.
50. Mueller D.S., Harman G.L., Pedersen W.L.: Effect of crop rotation and tillage system on *Sclerotinia* stem rot on soybean. Canadian Journal of Plant Pathology, 2002, **24**: 450-456.
51. O'Sullivan C.A., Belt K., Thatcher L.F.: Tackling control of cosmopolitan phytopathogen: *Sclerotinia*. Frontiers in Plant Science, 2021, **12**: 707509.
52. Peltier A.J., Bradley C.A., Chilvers M.I., Malvick D.K., Mueller D.S., Wise K.A., et al.: Biology, yield loss and control of *Sclerotinia* stem rot of soybean. Journal of Integrated Pest Management, 2012, **3**: B1-B7.
53. Pérez-García A., Romero D., de Vicente A.: Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. Current Opinion in Biotechnology, 2011, **22**: 187-193.
54. Purdy L.H.: *Sclerotinia sclerotiorum*: history, Diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. American Phytopathological Society, 1979, **69(8)**: 875-880.
55. Rollins J.A., Dickman M.B.: pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a pacC/RIM1 homolog. Applied and Environmental Microbiology, 2001, **67**: 75-81.
56. Rousseau G., Rioux S., Dostaler D.: Effect of crop rotation and soil amendments on *Sclerotinia* stem rot on soybean in two soils. Canadian Journal of Plant Science, 2007, **87**: 605-614.
57. Saharan G.S., Mehta N.: *Sclerotinia* diseases of crop plants: biology, ecology and disease management. Berlin: Springer, 2008, pp. 486.
58. Schwartz H.F., Steadman J.R.: Factors affecting sclerotium population of and apothecium production by *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathology, 1978, **68**: 383-388.
59. Smolińska U., Kowalska B.: Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* – review. Journal of Plant Pathology, 2018, **100**: 1-12.
60. Starzycka E., Starzycki M., Cichy H., Cicha A., Budzianowski G., Szachnowska H.: Odporność wybranych odmian rzepaku ozimego [*Brassica napus* L.] na porażenie grzybem *Sclerotinia sclerotiorum* [Lib.] de Bary. Rośliny Oleiste-Oilseed Crops, 2004, **25(2)**: 645-654.
61. Starzycki M., Starzycka E., Krzymański J., Matuszczak M.: Alloplasmic seeds of winter oilseed rape obtained from interspecific crosses in the family *Brassicaceae* K., (in Polish: Alloplazmatyczny rzepak ozimy otrzymany z krzyżowań międzygatunkowych w rodzinie *Brassicaceae* K.). Rośliny Oleiste-Oilseed Crops, 1999, **20(1)**: 43-49.
62. Thatcher L.F., Myers C.A., Pain N., O'Sullivan C.A., Roper M.M.: A *Sclerotinia* disease assay for screening flowering canola plants in controlled environments. Australasian Plant Pathology, 2017, **46**: 333-338.

63. Th o m m a B.P.H.J.: *Alternaria* spp. from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 2003, **4**: 225-236.
64. T o w n s e n B.B., Willetts H.J.: The development of sclerotia in certain fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 1954, **37**: 213-221.
65. T u r n e r G.J., T r i b e H.T.: On *Coniothyrium minitans* and its parasitism of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 1976, **66**: 97-105.
66. W i l l b u r J., M c c a g h e y M., K a b b a g e M., S m i t h D.L.: An overview of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: impact, fungal biology, and current management strategies. *Tropical Plant Pathology*, 2019, **44**: 3-11.
67. W i l l e t s H.J., W o n g J.A.L.: The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*. *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. *Botanical Review*, 1980, **46**: 101-165.
68. W i l l i a m s B., K a b b a g e M., K i m H.J., B r i t t R., D i c k m a n M.B.: Tipping the balance: *Sclerotinia sclerotiorum* secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment. *PLoS Pathogens*, 2011, **7**: e1002107.
69. W o l f F.A., C r o w e l l R.O.: Clover stem rot. North Carolina Agricultural Experiment Station, *Tech. Bull.*, 1919, **16**: 1-22.
70. W u B.M., S u b b a r a o K.W., L i u Y.B.: Comparative survival of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. *Phytopathology*, 2008, **98**: 1144-1152.
71. X u L., L i G., J i a n g D., C h e n W.: *Sclerotinia sclerotiorum*: An evaluation of virulence theories. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2018, **56**: 311-338.
72. Y o u n g C.S., C l a r k s o n J.P., S m i t h J.A., W a t l i n g M., P h e l p s K., W h i p p s J.M.: Environmental conditions influencing *Sclerotinia sclerotiorum* infection and disease development in lettuce. *Plant Pathology*, 2004, **53**: 387-397.
73. Y o u n g C.S., W e r n e r C.P.: Infection routes for *Sclerotinia sclerotiorum* in apetalous and fully petalled winter oilseed rape. *Plant Pathology*, 2012, **61**: 730-738.
74. Y u e n G.Y., K e r r E.D., S t e a d m a n J.R., C r a i g M.L.: Influences of antagonist population levels, blossom development stage, and canopy temperature on the inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* on dry edible bean by *Erwinia herbicola*. *Phytopathology*, 1994, **84**: 495-501.
75. Z e l i n g e r S., O m a n n M.: *Trichoderma* biocontrol: Signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene Regulation and Systems Biology*, 2007, **1**: 227-234.
76. Z e n g W., K i r k W., H a o J.: Field management of *Sclerotinia* stem rot of soybean using biological control agents. *Biological Control*, 2012, **60**: 141-147.
77. Z h a n g F., G e H., Z h a n g F., G u o N., W a n g Y., C h e n L., J i X., L i C.: Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, **100**: 64-74.

---

Adres do korespondencji:

mgr Diana Czarnecka  
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin  
IUNG-PIB  
ul. Czartoryskich 8  
24-100 Puławy  
tel. 81 4786 934  
e-mail: [dczarnecka@iung.pulawy.pl](mailto:dczarnecka@iung.pulawy.pl)

Magdalena Kawka-Lipińska, Anna Trojak-Goluch

*Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy  
w Puławach*

POLIPLOIDY TYTONIU I CHMIELU – METODY OTRZYMYWANIA,  
OCENA FENOTYPU, SKŁADU CHEMICZNEGO ORAZ WYKORZYSTANIE  
W HODOWLI\*

**Słowa kluczowe:** poliploidyżacja, związki antymitotyczne, krzyżowanie międzygatunkowe, chmiel, tytoń, podwojone haploidy, cechy morfologiczne, skład chemiczny

---

**Wstęp**

Poliploidyżacja jest jednym z najpowszechniejszych zjawisk występujących w procesie ewolucji roślin. Obecnie niemal połowę gatunków uprawnych stanowią poliploidy (48). Są to zazwyczaj autopoliploidy, które powstały poprzez podwojenie jednogatunkowego zestawu chromosomów lub allopoliploidy, u których z kolei zwielokrotnieniu uległy genomy dwóch lub kilku gatunków, prowadząc tym samym do powstania zupełnie nowego gatunku (23). Przykładem naturalnego allopoliploida jest tytoń szlachetny *Nicotiana tabacum* L. ( $2n = 4x = 48$ ), który powstał w wyniku podwojenia liczby chromosomów po hybrydyzacji *N. sylvestris* (Spegazzini i Comes) ( $2n = 2x = 12$ ) i *N. tomentosiformis* (Goodspeed) ( $2n = 2x = 12$ ) (31). Szczególnymi formami poliploidów są autoallopoliploidy oraz segmentalne allopoliploidy (54). Wśród metod uzyskiwania poliploidów należy wymienić spontanicznie występujące zaburzenia mejozy prowadzące do powstania niezredukowanych gamet i zaburzenia mitozy zwykle w komórkach merystematycznych (46) oraz indukcję z wykorzystaniem różnych środków chemicznych, głównie cytostatyków zaburzających działanie wrzeciona kariokinetycznego (18, 53). Rośliny poliploidalne w porównaniu z formami diploidalnymi odznaczają się najczęściej zwiększonym rozmiarem komórek, większymi organami wegetatywnymi oraz większą biomasa. Zazwyczaj także są bardziej odporne na stresy abiotyczne i biotyczne oraz wykazują zmiany w zawartości i jakości

---

\*Opracowanie wykonano w ramach zadania 6.3 pt. „Upowszechnianie wiedzy o wynikach uzyskiwanych w ramach realizacji zadania (hodowla i nasiennictwo chmielu i tytoniu)” z dotacji budżetowej przeznaczonej na realizację zadań MRiRW w 2022 r.



substancji czynnych (46). Zwielokrotnienie genomów jest zatem często stosowane przez hodowców w celu poprawy wybranych cech roślin użytkowych, uzyskania odporności na choroby, ale także przewycięzania nieżywołności i niepłodności mieszańców międzygatunkowych (46). Otrzymywanie poliploidów, w szczególności triploidów jest alternatywą do osiągnięcia sterylności genetycznej, która została wykorzystana w programach hodowlanych wielu gatunków roślin, np. do produkcji bezpestkowych owoców cytrusowych (10) czy uzyskania niemal beznasiennych szyszek chmielu (1, 64).

### Metody otrzymywania poliploidów tytoniu i chmielu

W świecie roślin istnieje szereg metod zwielokrotnienia genomu. Poliploidyzaacja może zachodzić na skutek zakłóceń podziałów mejotycznych lub mitotycznych. Zaburzenia podziałów mejotycznych mogą powstawać spontanicznie. Właśnie takie zjawisko i pojawienie się niezredukowanych gamet wystąpiło między innymi u bezpłodnych międzygatunkowych mieszańców (amfihaploidów) *N. tabacum* × *N. glauca* Grah. (57). Fuzja gamet  $2n$  tychże mieszańców dała początek płodnym osobnikom amfidiploidalnym. Powielenie genomu i powstawanie gamet  $2n$  może być wywołane także czynnikami zewnętrznymi, wśród których wymieniane są, m.in.: wysoka temperatura, zranienia roślin, niedobór wody czy składników odżywczych (32, 43).

W przypadku zaburzeń mitozy poliploidyzaacja może zachodzić spontanicznie, zwykle poprzez podwojenie liczby chromosomów w komórkach merystematycznych lub w wyniku indukcji z wykorzystaniem związków antymitotycznych, najczęściej kolchicyny lub oryzaliny. Kolchicyna ( $C_{22}H_{25}O_6N$ ) pozyskiwana z nasion i cebulek *Colchicum autumnal* L. zakłóca przebieg tworzenia wrzeciona kariokinetycznego i blokuje rozejście się siostrzanych chromatyd do biegunów komórki w anafazie mitozy. O efektywności tego procesu decyduje wiele czynników, takich jak: genotyp rośliny, rodzaj eksplantatu, warunki wzrostu czy sposób aplikacji, tj. czas ekspozycji i stężenie środka antymitotycznego (13). Optymalną dawkę kolchicyny oraz czas inkubacji dobiera się eksperymentalnie, w zależności od gatunku rośliny i warunków wzrostu (18). Kolchicyna jest stosowana w formie czystych roztworów wodnych lub roztworów wodnych z agarem. Może być używana *in situ* na roślinach rosnących na polu lub w szklarni oraz w warunkach aseptycznych kultur *in vitro*. W przypadku tytoniu najczęściej jest aplikowana *in vivo* podczas kiełkowania nasion lub rozwoju stożków wzrostu (5). Berbeć (4) prowadził 4-godzinną inkubację kiełkujących nasion w 0,2% roztworze kolchicyny w temperaturze  $27^{\circ}C$  i uzyskał tetraploidalne rośliny *N. tabacum* odmiany Nadwiślański Mały ( $2n = 96$ ). Otrzymane poliploidy skrzyżował z *N. alata* Link et Otto ( $2n = 18$ ) i otrzymał seskwidiploidalne formy mieszańcowe. Z kolei El-Morsy i in. (18), mocząc nasiona w wodnym roztworze kolchicyny, otrzymali tetraploidalne formy *N. alata*. Najwyższą wydajność osiągnęli po zastosowaniu 0,5% roztworu kolchicyny przez 48 godzin. Warmke i Blekeslee w roku

1939 (66) użyli kolchicyny *in vivo* do podwojenia liczby chromosomów mieszańców *N. tabacum* × *N. glutinosa* L. Oprócz trucizn mitotycznych innymi czynnikami indukującymi poliploidalność w komórkach somatycznych mogą być bardzo wysokie lub bardzo niskie temperatury, promieniowanie X czy uszkodzenia roślin (39). Poliploidy tytoniu można także otrzymać, stosując technikę regeneracji roślin z fragmentów walca osiowego łodygi. Pierwszą poliploidyzację mitotyczną tytoniu w warunkach *in vitro*, wykorzystującą jako eksplantaty fragmenty walca osiowego łodygi przeprowadzili Murashige i Nakano w 1966 r. (40). W wyniku spontanicznej poliploidyzacji w warunkach *in vitro* otrzymali kalus z komórkami poliploidalnymi i aneuploidalnymi. Również poprzez kulturę na pożywce LS wzbogaconej kinetyną o stężeniu  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  i IAA (kwas indolilo-3-octowy) w ilości  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (37) można zaindukować podział komórek, tworzenie tkanki kalusowej i regenerację pędów (15). Część uzyskanych regeneratów wskutek spontanicznej poliploidyzacji ma podwojoną w stosunku do roślin wyjściowych liczbę chromosomów w komórkach somatycznych. Doroszeńska i Berbec (16) w wyniku kultury fragmentów rdzenia łodygi mieszańców  $F_1$  *N. tabacum* × *N. africana* Merx. ( $2n = 47$ ) uzyskali formy mieszańcowe zawierające podwojoną liczbę chromosomów ( $2n = 94$ ).

Poliploidy tytoniu można także otrzymać, stosując kontrolowane krzyżowanie międzygatunkowe. Clausen i Goodspeed (9), krzyżując gatunek *N. glutinosa* z *N. tabacum*, uzyskali nowy, syntetyczny, amfidiploidalny gatunek *N. digluta*. Natomiast Ternovsky (56), krzyżując *N. tabacum* z *N. glauca*, otrzymał syntetyczny, amfidiploidalny gatunek *N. ditagla*.

W przypadku chmielu otrzymywanie poliploidów w warunkach *in vivo* zapoczątkował w 1948 r. Dark (12). W latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych ubiegłego wieku istotne zasługi dla hodowli poliploidów tego gatunku wnieśli Roborgh (44) i Haunold (26). Roborgh (44) opracował technikę indukcji tetraploidów polegającą na zanurzaniu wierzchołków pędów wraz z trzema parami pąków bocznych w roztworze kolchicyny. Wykazał, że optymalne stężenie antymitotyku wynosi 2 i 3%, natomiast czas inkubacji 6 godzin. Z kolei Haunold (26), stosując raz dziennie przez 4 dni 0,5 lub 0,75% wodny roztwór kolchicyny na pąki boczne, uzyskał szereg tetraploidów odmiany Fuggle. W prace nad uzyskiwaniem poliploidów chmielu zaangażowany był także Roy wraz z zespołem (45). Opracował technikę indukcji poliploidów chmielu odmiany H138 w warunkach *in vitro*. Umieszczał 3–6 mm pąki wierzchołkowe w płynnym podłożu MS zawierającym różne stężenia kolchicyny – 0,01%; 0,05%; 0,1% i 0,5% i inkubował w temperaturze  $25^\circ\text{C}$  przez 24, 48, 72, 96 i 120 godzin. Najwyższy odsetek roślin (25,6%) z podwojoną zawartością DNA w komórkach uzyskał przy zastosowaniu 0,05% kolchicyny przez 48 godzin. Trojak-Goluch i Skomra (60) w celu indukcji tetraploidów chmielu odmiany Sybilla umieściły merystemy wierzchołkowe pędów w płynnej pożywce MS zawierającej kolchicynę w stężeniach: 0,01%; 0,05% i 0,1%. Inkubacja materiału roślinnego przebiegała na wytrząsarce rotacyjnej przez 24, 48 i 72 godziny. Podobnie

jak w badaniach Roya i in. (45) najwyższą wydajność poliploidyzacji uzyskano, utrzymując merystemy w 0,05% roztworze przez 48 godzin. Švécarová i in. (53) stosowali jeszcze inne techniki indukcji poliploidów. Prowadzili przez 2 tygodnie hodowlę fragmentów pędów z węzłami na podłożu MS wzbogaconym oryzaliną o stężeniach: 1; 5 lub 10  $\mu\text{M}$ . Ponadto umieścili fragmenty pędów na płynnej pożywce MS z dodatkiem oryzaliny o stężeniu 10 i 20  $\mu\text{M}$ . Znacznie bardziej efektywna okazała się pierwsza z metod, zwłaszcza wykorzystanie podłoża zawierającego 10  $\mu\text{M}$  oryzaliny. Natomiast Škof i in. (49) w celu poliploidyzacji genomu chmielu *in vitro* wykorzystali technikę organogenezy pośredniej pędów, w której regenerację pędów poprzedzało powstanie kalusa. Analiza poziomu ploidalności regeneratów wykazała wysoką frekwencję tetraploidów (58,6%). Dodatkową zaletą zastosowanej techniki w porównaniu z metodami wykorzystującymi środki antymitotyczne był całkowity brak miksploidów wśród regeneratów (49). Metodę organogenezy pośredniej do otrzymania tetraploidalnego chmielu wykorzystano także w IUNG-PIB w Puławach. Metoda ta jest uznawana za dość trudną z uwagi na to, że efektywność uzyskiwania poliploidów zależy od szeregu czynników, takich jak: rodzaj eksplantatu, genotyp rośliny, skład pożywki czy zastosowane hormony wzrostowe. W wyniku długotrwałej hodowli kalusa pochodzącego z łodyg i ogonków liściowych chmielu odmiany Iunga Trojak-Goluch i in. (61) otrzymały szereg tetraploidalnych roślin. W badaniu oceniono wpływ typu eksplantatu i regulatorów wzrostu na efektywność regeneracji roślin oraz indukcję poliploidów. Prowadzenie długotrwałej kultury kalusa powyżej 23 tygodni doprowadziło do podwojenia ilości DNA i pojawienia się tetraploidów wśród zregenerowanych roślin. Największą ich liczbę – 9,4%, uzyskano z kalusa pochodzącego z ogonków liściowych. Liczbę tworzących się poliploidów wyraźnie zwiększał dodatek IAA (kwas indolilo-3-octowy) do pożywki regeneracyjnej.

### Metody otrzymywania podwojonych haploidów (DH)

W badaniach nad uzyskiwaniem ulepszonych odmian tytoniu powszechnie stosowane jest zwielokrotnianie genomu i otrzymywanie homozygotycznych linii podwojonych haploidów (DH). Technika ta pozwala wydatnie skrócić czas wyhodowania nowej odmiany tytoniu, przywrócić płodność roślinom, wyeksponować cechy warunkowane przez geny recesywne. Podwojone haploidy tytoniu można uzyskać zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*. W metodzie *in vivo* wykorzystuje się pyłek dzikiego gatunku, np.: *N. africana* do zapylania *N. tabacum*. Zapylenie stymuluje podziały partenogenetyczne komórki jajowej i powoduje powstanie haploidalnych zarodków (14). W następnym etapie haploidalne siewki poddaje się działaniu cytostatyków i otrzymuje linie DH. Pierwsze podwojone haploidy tytoniu *in vitro* uzyskano w latach 60. XX wieku w wyniku kultury fragmentów liści (7). Do rutynowego otrzymywania podwojonych haploidów tytoniu w warunkach *in vitro* stosuje się jednak techniki androgenozy z wykorzystaniem niedojrzałych pylników lub izolowanych mikrospor.

Uzyskane haploidalne zarodki poddaje się najczęściej działaniu kolchicyny. Warto nadmienić, że bardzo skutecznym sposobem podwojenia materiału genetycznego haploidów jest organogeneza pośrednia lub bezpośrednia. W metodzie organogenezy pośredniej rozwój zarodków i roślin jest poprzedzony tworzeniem tkanki kalusowej. Z kolei w organogenezie bezpośredniej zarodki somatyczne i młode rośliny tworzą się bezpośrednio na powierzchni eksplantatu. Uzyskane w ten sposób regeneraty stanowią populację złożoną zarówno z haploidów, jak i podwojonych haploidów. Wysoką frekwencję linii DH tytoniu uzyskano po wyłożeniu fragmentów łodyg dojrzałych roślin haploidalnych na pożywkę MS wzbogaconą kinetyną o stężeniu  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  oraz kwasem indoliloctowym (IAA) w stężeniu  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (37). Hamada i in. (24) zastosowali jeszcze inne warunki regeneracji roślin, uzyskując zdecydowanie wyższą frekwencję podwojonych haploidów. Autorzy utrzymywali fragmenty łodyg w ciemności na pożywce MS zawierającej  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  IAA i  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  kinetyny. Następnie eksplantaty po 28 dniach przeniesiono na podłoże MS zawierające  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  IAA i  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  kinetyny lub  $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP (6-benzylaminopuryna) i oświetlano światłem fluorescencyjnym o natężeniu  $30,3 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

### Zmiany morfologii i składu ważnych metabolitów u poliploidów tytoniu i chmielu

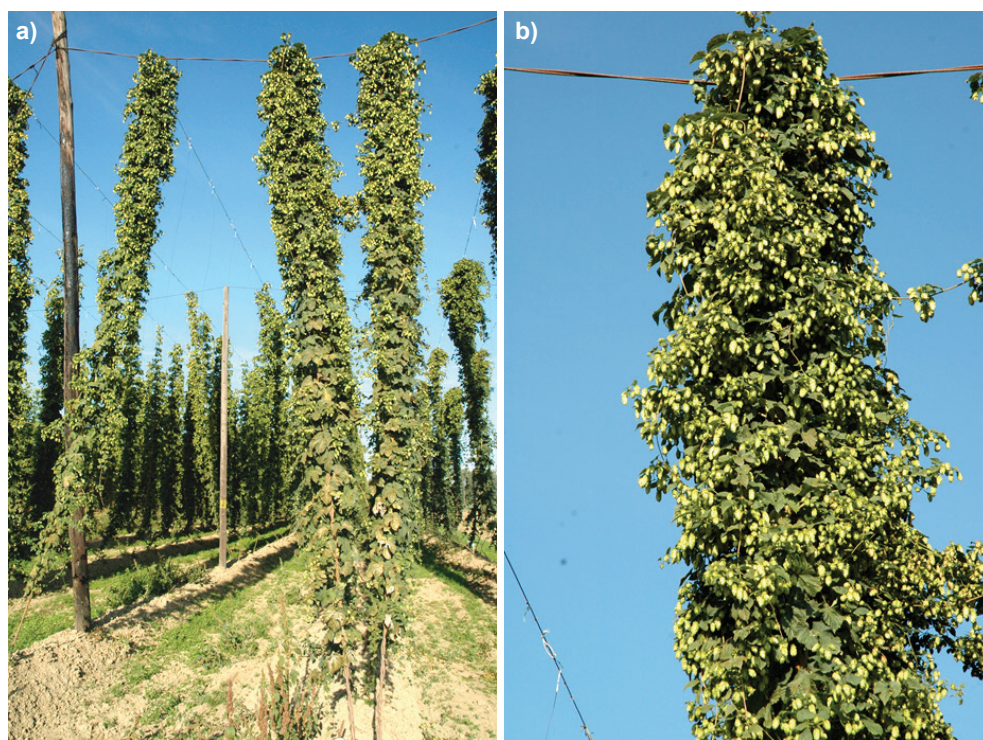
Modyfikacja poziomów ploidalności roślin powoduje zmiany wielkości komórek roślinnych, co z kolei prowadzi do zmian w anatomicznej strukturze organów, a także fizjologii roślin i ich składzie chemicznym. Zmiany morfologiczne dotyczą wielkości aparatów szparkowych oraz ich liczby przypadającej na jednostkę powierzchni, wielkości i liczby liści, korzeni, pędów, bulw, kłączy, kwiatów, nasion, pyłku, stosunku długości liści do ich szerokości, a także struktury ściany komórkowej (38). Rośliny poliploidalne różnią się też zwykle wysokością i ogólnym pokrojem od swoich diploidalnych odpowiedników. Zmiany fizjologiczne dotyczą natomiast transpiracji, aktywności fotosyntetycznej czy długości trwania fazy wegetatywnej i generatywnej (52, 55).

Jak wykazały badania Berbecia (4), tetraploidy *N. tabacum* Nadwiślański Mały ( $2n = 96$ ) charakteryzowały się wolniejszym wzrostem, grubszymi i bardziej kruchymi liśćmi o nieregularnym unaczynieniu oraz większymi pylnikami w stosunku do diploidów. Z kolei tetraploidy *N. alata* miały dłuższe łodygi oraz większą liczbę i długość międzywęźli w porównaniu z diploidami. Były większe, bardziej zielone, a ponadto odznaczały się większą liczbą liści w fazie formowania kwiatów. Dodatkowo tworzyły więcej kwiatów, które posiadały dłuższe szypułki kwiatowe i większą średnicę słupka. Nie wykazywały natomiast znaczących różnic w średnicy łodygi czy liczbie pędów przypadających na roślinę. Ponadto liście tetraploidów *N. alata* w porównaniu z diploidalnymi odpowiednikami zawierały więcej takich makroelementów, jak azot i fosfor (18). Trojak-Goluch i in. (62) przeprowadzili

ocenę morfologiczną oraz analizę składu chemicznego podwojonych haploidów (DH) mieszańców  $F_1$  powstałych ze skrzyżowania linii WGL3 odpornej na *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris z linią PW-834 odporną na TSWV (ang. *Tomato spotted wilt virus*). Podwojone haploidy kwitły później, były zwykle niższe i miały mniej liści niż ich formy rodzicielskie, co było cechą pojawiającą się z największą regularnością. Ich liście były węższe, co w konsekwencji przyczyniło się do spadku plonowania linii DH. Szczególnie wyraźne było zmniejszenie powierzchni środkowych liści. Natomiast połączenie odporności na *Th. basicola* i TSWV w jednym genomie nie miało wpływu na zmiany zawartości nikotyny i innych alkaloidów w porównaniu z formami rodzicielskimi.

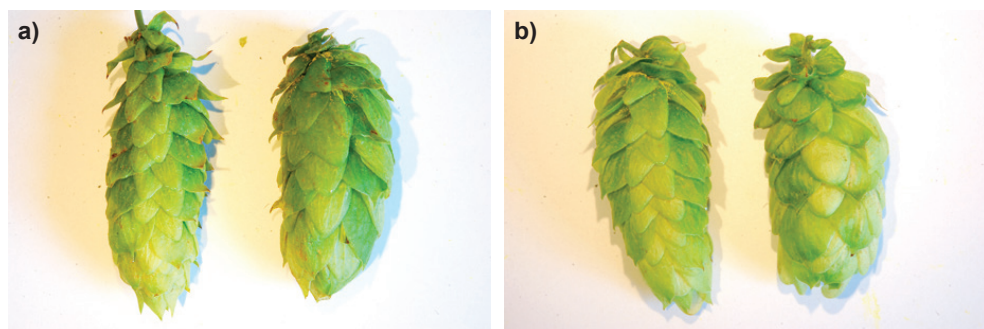
Triploidalny chmiel ( $2n = 3x = 30$ ) charakteryzuje się lepszą żywotnością, intensywnym wzrostem w porównaniu z diploidami ( $2n = 2x = 20$ ), a dodatkowo jest bardziej bujny i daje wyższy plon (42, 45). Dowodem na to mogą być przedstawione przez Haunolda (26) rezultaty dotyczące przyrostów diploidalnej i triploidalnej formy chmielu odmiany Fuggle. Autor wykazał, że dzienny przyrost roślin o zwiększonej ploidalności był o 18 mm większy niż ich diploidalnych odpowiedników. Z punktu widzenia producentów chmielu jedną z ważniejszych zalet triploidów jest wyższy potencjał plonowania w porównaniu z formami diploidalnymi. Probasco i in. (42) podali, że triploidalna odmiana Millennium miała o 560,7 kg większy plon niż macierzysta, diploidalna odmiana Nugget. Triploidy mają ponadto dłuższe międzywęzła i pędy owocujące, zmienną długość szyszek i odznaczają się wyższym wskaźnikiem skręcalności pędów, co pozwala im lepiej piąć się po konstrukcji. Najistotniejsze jest jednak to, że charakteryzują się prawie całkowitą beznasiennością. Ponieważ białka i tłuszcze zawarte w nasionach szyszek osobników żeńskich chmielu niekorzystnie wpływają na proces fermentacji piwa (30), surowiec uzyskany z beznasiennych szyszek jest najbardziej odpowiedni do produkcji granulatów i ekstraktów chmielowych. Jak podaje Haunold (26), przy swobodnym zapyleniu średnia liczba nasion w triploidalnych formach odmiany Fuggle wyniosła 1,7, podczas gdy w formach diploidalnych – 12,3. Także średnia masa nasion triploidów była znacznie niższa niż masa nasion diploidów (28). Pędy roślin triploidalnych w przeciwieństwie do tetraploidalnych są ułożone luźniej dzięki dłuższemu międzywęzłom. Wśród zalet chmielu triploidalnego należy wymienić także szybkie zamykanie się szyszek po uformowaniu, co znacznie ogranicza wnikanie do nich patogenicznych grzybów *Pseudoperonospora humuli* (Miyabe & Takah.) G.W. Wilson powodującego mączniaka rzekomego oraz *Podosphaera macularis* (Wallr.) U. Braun & S. Takam. powodującego mączniaka prawdziwego chmielu. Cecha ta przyczynia się do ograniczenia liczby zabiegów profilaktycznych na plantacji. Szyszki triploidów są bardziej wytrzymałe i mniej kruche, co pozwala na zachowanie surowca w lepszym stanie podczas mechanicznego zbioru i transportu (50), z drugiej jednak strony potrzebują one znacznie dłuższego czasu do osiągnięcia dojrzałości technologicznej. Wprowadzenie do uprawy odmian chmielu późno dojrzewających poszerzyłoby asortyment odmianowy

gatunku, co byłoby korzystne dla wielu gospodarstw, szczególnie tych wielkoobszarowych, w których uprawia się kilka odmian chmielu, gdyż pozwoliłoby rozłożyć w czasie zbiór szyszek (64). Krajl (33) donosiła, że w szyszkach triploidalnego chmielu odmiany Atlas zaobserwowała znacznie większą liczbę gruczołów lupulinowych niż w odmianie matecznej. Także średnica gruczołów lupulinowych była większa, co z kolei miało wpływ na zwiększoną zawartość żywic miękkich w szyszkach. Wszystkie triploidy uzyskane przez Trojak-Goluch i Skomrę (64) charakteryzowały się dłuższymi pędami owocującymi i dłuższymi międzywęzłami, co skutkowało luźniejszym pokrojem roślin (rys. 1), wyższym wskaźnikiem skręcalności pędów w porównaniu z diploidalną odmianą mateczną. Większość uzyskanych triploidów zawiązywała niewielką ilość nasion w szyszkach, a tylko dwa osobniki były prawie beznasienne i wytwarzały odpowiednio tylko 1,41 i 1,46 nasion na szyszkę (64) (rys. 2).



Rys. 1. Pokrój ogólny triploidalnych roślin chmielu (a) oraz ich owocostany (b)

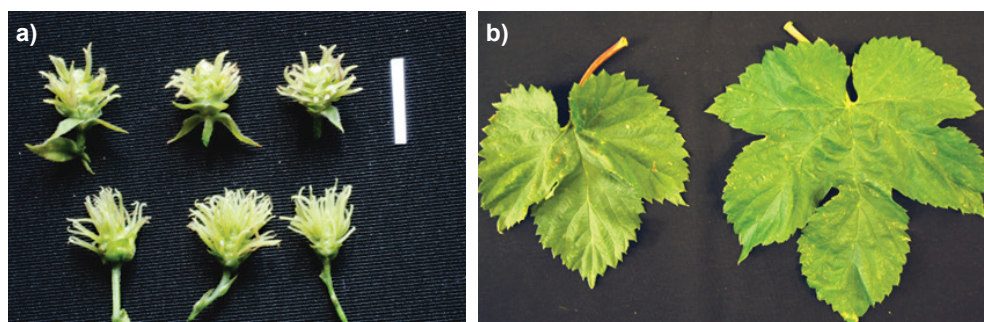
Źródło: A. Trojak-Goluch, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB



Rys. 2. Szyszki triploidalnych roślin chmielu: a) szyszka diploidalnej odmiany Sybilla (lewa strona panelu) oraz szyszka triploida ATG 16/33; b) szyszka diploidalnej odmiany Sybilla (lewa strona panelu) oraz szyszka triploida ATG 17/34

Źródło: A. Trojak-Goluch, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB

Tetraploidalne formy chmielu charakteryzują się znacznie gorszymi cechami użytkowymi w porównaniu z diploidami oraz triploidami, co sprawia, że nie znajdują zastosowania w produkcji rolniczej. Są niższe, mają znacznie mniejszą średnicę pędów, krótsze międzywęzła, co skutkuje wytwarzaniem krótszych pędów bocznych i bardziej zwartym pokrojem roślin (53, 60). Poza tym słabiej się ukorzeniają i gorzej aklimatyzują do warunków polowych. W badaniach prowadzonych w IUNG-PIB w Puławach z 20 roślin wysadzonych na polu po trzech latach przetrwało tylko 6 (60). Podobnie tetraploidalne sadzonki chmielu uzyskane przez Švécárová i in. (53) były mniejsze i słabiej się ukorzeniały. Dodatkowo tetraploidalny chmiel charakteryzuje się opóźnionym kwitnieniem i wytwarza mniejsze kwiaty żeńskie (rys. 3). Jego szyszki mają zwiększoną masę w stosunku do diploidów, co jednak nie jest korzystne ze względu na problemy w suszeniu takiego surowca. Gruczoły lupulinowe produkujące lupulinę są prawie dwa razy większe, natomiast jest ich znacznie mniej (60).



Rys. 3. Kwiaty i liście diploidalnego i tetraploidalnego chmielu odmiany Sybilla: a) kwiaty żeńskie roślin diploidalnych (dolna część fotografii) i roślin tetraploidalnych (górną część fotografii); b) liść rośliny tetraploidalnej (po lewej) i rośliny diploidalnej (po prawej)

Źródło: A. Trojak-Goluch, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB

Chmiel jest źródłem wielu substancji o zróżnicowanej aktywności biologicznej, w tym polifenoli, które wykazują silne działanie antyoksydacyjne i tym samym przeciwnowotworowe (21). Zaobserwowano, że poziom produkcji korzystnych metabolitów wtórnych lub zmiany ich składu i proporcji zależą od stopnia ploidalności roślin. Triploidy chmielu najczęściej wytwarzają znacznie lepszej jakości surowiec browarniczy, tj. o wyższej zawartości żywic miękkich, garbników i polifenoli w porównaniu z diploidami (34). Prabasco i in. (42) donoszą, że zawartość alfa kwasów w szyszkach triploidalnej odmiany Millenium sięga 15,5%, podczas gdy w macierzystej, diploidalnej odmianie Nugget wynosi 13,0%. Wskazują oni także na wyższą zawartość olejków eterycznych humulenu i kariofilenu, co nadaje piwu przyjemny, chmielowy aromat. Triploidalne odmiany chmielu Crystal, Mount Hood i Liberty uzyskane przez Haunolda i in. (29) także charakteryzują się wyższą zawartością alfa i beta kwasów oraz olejków chmielowych w porównaniu z diploidalną odmianą mateczną Hallertauer Mittlefrüh. Populacje triploidalnego chmielu uzyskane przez Trojak-Goluch i Skomrę (64) charakteryzują się zróżnicowaną zawartością alfa kwasów. Występują osobniki o stosunkowo niskiej zawartości tych związków. Ponadto wyselekcjonowano genotypy, które wyróżniają się wysoką zawartością alfa kwasów również w stosunku do roślin diploidalnych. Według doniesień literaturowych wraz z powieleniem genomu zmienia się również skład głównych związków chemicznych odpowiedzialnych za aromat. W przypadku tetraploidów chmielu całkowita zawartość olejków eterycznych ulega obniżeniu, natomiast notuje się wzrost zawartości cennego humulenu, limonenu, kariofilenu i farnezeny (60).

### **Wykorzystanie różnych metod poliploidyzacji oraz poliploidów w hodowli tytoniu i chmielu**

W wielu programach hodowlanych do krzyżowania z tytoniem szlachetnym wykorzystuje się dzikie gatunki z rodzaju *Nicotiana*. Znaczna ich część posiada bowiem genetycznie warunkowaną odporność przynajmniej na jedną chorobę bądź szkodnika. Krzyżowanie dzikich krewniaków z gatunkiem uprawnym daje szansę przeniesienia genów, które warunkują odporność na patogeny czy wpływają na lepszy plon. Technika ta wiąże się jednak z wieloma problemami wynikającymi z barier krzyżowalności form rodzicielskich, do których należą niezgodność krzyżówkowa, niska przeżywalność mieszańców czy ich bezpłodność. Bieźpłodność mieszańców *Nicotiana* wywołana jest głównie różnicami w liczbie chromosomów gatunków rodzicielskich oraz strukturalnymi różnicami w chromosomach zaburzającymi ich koniugację. Poliploidyzacja jest wykorzystywana do przywracania płodności sterylnym mieszańcom międzygatunkowym. Przykładem mogą być prace nad przeniesieniem odporności na czarną zgniliznę korzeni z *N. glauca* do genomu Wiślicy, których efektem było uzyskanie początkowo linii hodowlanych WGL, a następnie w wyniku dalszego doskonalenia użytkowego tych linii – odpornej, cytoplazmatycznie męskosterylnej odmiany Wigola. W trakcie



procesu hodowlanego uzyskano bezpłodne mieszańce międzygatunkowe *N. tabacum* Wiślica  $\times$  *N. glauca* (amfihaploidy), których siewki przez 4 godziny poddano działaniu 0,25% roztworu kolchicyny celem podwojenia liczby chromosomów. W efekcie otrzymano częściowo płodne amfidiploidy, które następnie skrzyżowano wstecznie z *N. tabacum* i otrzymano płodne seskwidiploidy (pokolenie BC<sub>1</sub>) (57, 58). Innym przykładem wykorzystania poliploidyzacji do przywrócenia płodności mieszańcom międzygatunkowym są prace nad liniami hodowlanymi BPA. W wyniku spontanicznego podwojenia liczby chromosomów na wczesnym etapie rozwoju międzygatunkowych mieszańców *N. tabacum*  $\times$  *N. africana* uzyskano płodne, zawierające po dwa haploidalne genomy każdego z gatunków, genotypy (16). W kolejnych etapach programu hodowlanego zostały one skrzyżowane z *N. tabacum* i dały początek seskwidiploidom. Dalsze krzyżowanie wsteczne seskwidiploidów z tytoniem pozwoliło uzyskać kolejne pokolenia i ostatecznie doprowadziło do uzyskania stabilnych linii hodowlanych BPA wykazujących tolerancję na PVY (17). Uzyskanie poliploidów, w tym amfidiploidów, następnie ich krzyżowanie z drugim tetraploidalnym gatunkiem rodzicielskim bądź krzyżowanie amfidiploida z gatunkiem diploidalnym pozwala uzyskać częściowo płodne pokolenie seskwidiploidalne i jest najskuteczniejszym sposobem przywracania płodności mieszańcom międzygatunkowym (16).

Rośliny poliploidalne mogą stanowić także formę pomostową w tzw. bridge crossing, kiedy bezpośrednie krzyżowanie dwóch gatunków nie jest możliwe ze względu na niezgodność genetyczną. W charakterze formy pomostowej wykorzystuje się trzeci gatunek, który jest zgodny z docelowymi gatunkami rodzicielskimi bądź formę poliploidalną jednego z gatunków rodzicielskich. W celu przeniesienia reakcji nadwrażliwości na TSWV z *N. alata* do *N. tabacum* jako formy pomostowej użyto *N. otophora* Grise. (20). Amfidiploidy *N. tabacum*  $\times$  *N. alata* skrzyżowano wstecznie z *N. tabacum*, a następnie uzyskane seskwidiploidy skrzyżowano z mieszańcem amfidiploidalnym *N. tabacum*  $\times$  *N. otophora* (19). Uzyskano kilka płodnych linii hodowlanych wykazujących reakcję nadwrażliwości na TSWV, w tym ostatecznie należąca do typu papierosowego ciemnego odmianę Polalta. Nadwrażliwość otrzymanych kreacji hodowlanych była jednak związana z występowaniem deformacji morfologicznych roślin w postaci nieregularnego unerwienia liści, guzów na kwiatostanach. Chaplin i Mann (8) w celu przewyciężenia niezgodności krzyżówkowej pomiędzy *N. tabacum* a dzikimi gatunkami *N. rustica* L. oraz *N. alata* użyli tetraploidalnych form tytoniu. Metoda krzyżowania przy użyciu tetraploidów tytoniu okazała się także przydatna w uzyskiwaniu żywotnych mieszańców *N. tabacum* i *N. alata*, które zamierały w fazie siewki (4). Laskowska i Berbec (35) w swoich badaniach skrzyżowali tetraploidy *N. tabacum* TB-566 z *N. alata*, w wyniku czego uzyskali seskwidiploidalnego mieszańca *N. tabacum* TB-566 tetra  $\times$  *N. alata* o znacznym tempie wzrostu i przeżywalności. Następnie formę seskwidiploidalną krzyżowali wstecznie z *N. alata* i uzyskali żywotnego mieszańca (*N. tabacum* TB-566 tetra  $\times$  *N. alata*)  $\times$  *N. alata*. Zaletą wykorzystania w hodowli tytoniu tetraploidalnych form *N. tabacum*

jest nie tylko możliwość ominięcia barier krzyżowalności, ale także pominięcie etapu otrzymywania amfidiploidów i tym samym skrócenie czasu niezbędnego do uzyskania pokolenia seskwidiploidów (6).

Opracowanie i stosowanie efektywnych metod powielania genomu roślin haploidalnych w celu produkcji płodnych, homozygotycznych linii podwojonych haploidów (DH) jest stałą częścią wielu programów hodowlanych realizowanych w kraju i na świecie. W IUNG-PIB technika androgenezy, następnie podwojenia liczby chromosomów zostały wykorzystane między innymi do otrzymania odpornych na czarną zgniliznę korzeni linii DH. Materiał wyjściowy w badaniach stanowiły mieszańce podatnej na czarną zgniliznę korzeni odmiany K 326 i odpornej odmiany Wentura. Spośród 24 otrzymanych linii DH osobniki odporne stanowiły 20,8%. Ostatecznie do dalszych prac hodowlanych wybrano jedną linię DH wyróżniającą się najlepszymi cechami użytkowymi (59) (rys. 4). Podobne techniki stosowali Laskowska i Berbec (36), którzy uzyskali podwojone haploidy mieszańców  $F_1$  *N. tabacum* Polalta × Wiślica charakteryzujące się pełną odpornością na TSWV pochodzącą od odmiany Polalta oraz brakiem deformacji morfologicznych liści. Wymienione linie DH wykazywały wiele cech charakterystycznych dla tytoniu papierosowego ciemnego reprezentowanego przez odmianę rodzicielską Polalta, dlatego zostały włączone do dalszych prac hodowlanych obejmujących odtworzenie i doskonalenie cech tytoniu papierosowego jasnego reprezentowanego przez odmianę Wiślica. Podwojone haploidy otrzymano także w wyniku kultury fragmentów łodyg haploidów uzyskanych z odmiany Wiślica, linii hodowlanych PW834 i WGL3 oraz dwukierunkowych mieszańców  $F_1$  linii hodowlanych BPA i WGL3, WABPA3 i WGL3, PW834 i WGL3. W zależności od kombinacji mieszańcowej podwojone haploidy stanowiły od 10,61% do 32,99% ogółu regeneratów (63). Techniki poliploidyzacyjne wykorzystano także w IUNG-PIB do szybkiego otrzymania stabilnych, transgenicznych linii podwojonych haploidów odpornych na najważniejsze gospodarczo izolaty wirusa Y ziemniaka (PVY). Formy haploidalne mieszańców transgenicznych linii hodowlanych z formami nietransformowanymi poddano diploidyzacji, stosując kolchicynę oraz metodę regeneracji pędów z fragmentów łodyg *in vitro*. Druga z zastosowanych metod okazała się wydajniejsza w otrzymaniu linii podwojonych haploidów (11). Również w literaturze światowej można znaleźć wiele przykładów otrzymywania linii DH w tytoniu. Walker i Aycock (65) skrzyżowali tytoń Maryland MD 609 wykazujący odporność na *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Breda de Haan) z tytoniem MD 341 odpornym na wirusa mozaiki tytoniu (TMV) i *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wol & Foster) Young et al. Spośród 315 haploidalnych roślin mieszańcowych uzyskanych drogą androgenezy otrzymali 133 podwojone haploidy, z czego 16 (12%) wykazywało poziom odporności równy odmianie MD 609. Z kolei Smalcelj i Curkovic Perica (51) skrzyżowali chorwacką linię GV3 odporną na mączniaka rzekomego tytoniu i PVY z niemiecką, odporną na PVY, ale podatną na mączniaka odmianą Virginia D i uzyskali mieszańca DH10. Mieszaniec ten wyka-

zywał odporność na PVY. Hamada i in. (24), stosując połączoną technikę androgenyzy oraz naświetlanie wiązką jonów, otrzymali haploidalne mutanty odporne na wirusa PVY, a następnie, stosując metodę regeneracji fragmentów łodyg, uzyskali podwojone haploidy z frekwencją 45,7% ogółu badanych. Spośród roślin następnego pokolenia uzyskanych w wyniku samozapylenia około 50% wykazywało odporność na PVY (24). Indukcją podwojonych haploidów zajmowali się także Shahadati-Moghaddam i in. (47). Do badań wybrali odporną na PVY odmianę VAM i wysokiej jakości, ale podatną na PVY odmianę K326. Pylniki mieszańców  $F_1$  wyłożono na pożywkę MS, a następnie powstałe zarodki somatyczne poddano działaniu kolchicyny (0,4%) przez 8 godzin. Powstałe sadzonki przeniesiono ze szklarni na pole i poddano samozapyleniu. Ostatecznie uzyskano trzy odporne na PVY linie DH o pożądanym cechach morfologicznych i chemicznych.



Rys. 4. Podwojony haploid wyprowadzony z mieszańca tytoniu odmian K326 i Wentura:

a) pokrój ogólny rośliny i b) wygląd liścia

Źródło: A. Trojak-Goluch, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB

Formy poliploidalne roślin przemysłowych takich jak tytoń i chmiel są wykorzystywane nie tylko jako narzędzie do pokonywania barier krzyżowalności, ale także

do generowania genotypów o pożądanym cechach użytkowych. W hodowli chmielu tetraploidy są wykorzystywane jako formy rodzicielskie do produkcji odmian triploidalnych, które pod względem genotypowym i fenotypowym są zbliżone do odmiany matecznej. Jest to bardzo istotne w hodowli tej rośliny, ponieważ pozwala zachować korzystne cechy odmiany matecznej, a jednocześnie daje możliwość pewnej zmienności gatunku, np. wprowadzenia nowych cech użytkowych pochodzących od genotypu męskiego. Większość triploidalnych odmian chmielu otrzymano w wyniku kontrolowanego lub naturalnego zapylenia tetraploidalnych form żeńskich uznanej odmiany diploidalnym pyłkiem męskim (3, 42). Rośliny triploidalne mogą także powstać w potomstwie roślin uzyskanych w wyniku niekontrolowanego zapylenia triploidów pyłkiem roślin diploidalnych (2). Ponadto uzyskano triploidalną roślinę chmielu, w wyniku krzyżowania diploidalnej odmiany Talisman z osobnikiem męskim, który powstał z kolei ze skrzyżowania diploidalnej odmiany Lubelski z chmielem męskim pochodzącym z Jugosławii (22). Wymieniony poliploidalny osobnik chmielu powstał prawdopodobnie w wyniku połączenia gamet, z których jedna nie uległa redukcji w procesie mejozy. Na plantacjach chmielu nadal przeważają odmiany diploidalne ( $2n = 2x = 20$ ), ale wieloletnie prace nad uzyskaniem pożądanym odmian triploidalnych ( $2n = 3x = 30$ ) zaowocowały wprowadzeniem ich do uprawy w wielu krajach świata. Próby uprawy chmielu triploidalnego były podejmowane w Stanach Zjednoczonych już w latach 70. XX wieku (25). Haunold (25), krzyżując tetraploidalne formy odmiany Fuggle z diploidalnymi osobnikami męskimi, uzyskał 778 mieszańców roślin, z których większość, bo aż 76,3% stanowiły triploidy, natomiast 20,8% – aneuploidy. Badania te doprowadziły do uzyskania i wprowadzenia do uprawy w 1977 r. aromatycznych, triploidalnych odmian chmielu Willamette i Columbia, które charakteryzowały się intensywnym wzrostem i dawały wysoki plon (27). Haunold i Nickerson (28) prowadzili także badania nad wykorzystaniem triploidalnego pyłku do poprawy plonowania, a także poprawy jakości surowca chmielowego na plantacjach. Zapylenie diploidalnych roślin żeńskich Brewer's Gold pyłkiem triploidalnym spowodowało istotny wzrost plonu uzyskiwanego z jednostki powierzchni w wyniku zwiększenia wielkości i masy szyszek chmielowych. W uzyskanym surowcu stwierdzono także istotnie mniejszą ilość nasion, które zawierały 23% mniej tłuszczu i 14% mniej białka niż w przypadku surowca uzyskanego w wyniku wolnego zapylenia odmiany Brewer's Gold męskim pyłkiem diploidalnym. Innymi odmianami triploidalnymi uzyskanymi przez Haunolda i in. (29) były Crystal, Mount Hood i Liberty. Odmiany te w porównaniu z aromatyczną, diploidalną odmianą Hallertauer Mittlefrüh, z której się wywodzą dawały prawie dwukrotnie większe plony. Beatson i Brewer (1) uzyskali triploidalne, wartościowe odmiany Pacific Gem, Wakatu i Pacifica. Wszystkie były niemal beznasienne i zawierały znacznie większe ilości alfa kwasów niż ich formy rodzicielskie. Krajl (41) w latach 90. uzyskał szereg triploidalnych odmian aromatycznych, m.in.: Cekin, Celeia, Cerea, Cicero (41). Prace hodowlane nad uzyskaniem wysokogoryczkowych i aromatycznych triploidalnych

odmian chmielu prowadzone są także w IUNG-PIB. Przeprowadzono konwencjonalne krzyżowanie tetraploidalnych form aromatycznej odmiany Sybilla z diploidalnymi osobnikami męskimi i otrzymano 6 populacji mieszańcowych  $F_1$ , z czego 83,8% stanowiły formy triploidalne, natomiast 15,2% – aneuploidy. Wyselekcjonowano genotypy charakteryzujące się lepszymi cechami morfologicznymi oraz wyższą zawartością alfa kwasów w porównaniu z formą diploidalną. Genotypy te mogą być źródłem surowca dla przemysłu piwowarskiego (64).

### Podsumowanie

Poliploidyżacja jest powszechnym, cennym narzędziem w programach hodowlanych wielu roślin, w tym także chmielu i tytoniu, a jej zastosowanie nie ogranicza się do poprawy potencjału plonowania. Poliploidy są ważne jako formy pomostowe dla transferu genetycznego między gatunkami, u których bezpośrednie krzyżowanie nie jest możliwe, jak również do przywracania płodności sterylnym mieszańcom. Zastosowanie przez hodowców poliploidyżacji jako narzędzia pozwoliło na uzyskanie nowych, lepiej plonujących i odpornych odmian. Od czasu odkrycia kolchicyny zwielokrotnianie genomów *in vitro* z zastosowaniem tego antymitotyku jest najczęściej stosowane, ponieważ daje możliwość większej kontroli tego procesu, co zwiększa efektywność i tempo powstawania roślin poliploidalnych. W przypadku pozostałych metod poliploidyżacji głównymi przeszkodami są niska częstotliwość wytwarzania niezredukowanych gamet czy pracochłonność, długi czas trwania oraz niska efektywność organogenezy w kulturach *in vitro*. Jednym z priorytetów programów hodowlanych chmielu jest pozyskanie nowych, beznasiennych odmian triploidalnych i tym samym surowca dobrej jakości. W hodowli tytoniu krzyżowanie międzygatunkowe i połączenie metod hodowli tradycyjnej z technikami biotechnologicznymi, w tym poliploidyżacją w warunkach *in vitro*, wpływa na skrócenie procesu hodowlanego i daje szansę na uzyskanie ulepszonych, odpornych genotypów tytoniu, które decydują o opłacalności produkcji. Poza tym w ostatnich dekadach dzięki wykorzystaniu najnowszych technik biologii molekularnej nastąpił znaczny postęp w badaniach wyjaśniających, w jaki sposób zmiany wielkości genomu, w tym poliploidyżacja, wpływają na cechy fenotypowe i fizjologię roślin oraz skład chemiczny surowca.

### Literatura

1. Beaton R.A., Brewer V.R.: Regional trial evaluation and cultivar selection of triploid hop hybrids. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 1994, **22**: 1-6.
2. Beaton R.A., Ferguson A.R., Weir I.E., Graham K.A., Ansell K.A., Ding H.: Flow cytometric identification of sexually derived polyploids in hop (*Humulus lupulus* L.) and their use in hop breeding. *Euphytica*, 2003, **134**: 189-194.

3. Beaton R.A., Alspach P.: Breeding and development of triploid aroma cultivars. Proceedings of the Scientific Commission IHGC, Tettngang, Germany, June 24–28, 2007, pp. 19-21.
4. Berbeć A.: Cytogenetical study on *Nicotiana tabacum* L. cv. Nadwiślański Mały (2x and 4x) × *Nicotiana alata* Link et Otto hybrids. *Genetica Polonica*, 1987, **28(3)**: 251-261.
5. Berbeć A., Doroszevska T.: Formy tetraploidalne dzikich gatunków *Nicotiana* uzyskane w Zakładzie Hodowli i Uprawy Tytoniu IUNG w Puławach. *Pamiętnik Puławski*, 1991, **99**: 195-204.
6. Berbeć A., Doroszevska T.: The Use of *Nicotiana* species in tobacco improvement. In book: *The Tobacco Plant Genome*, 2020, pp. 101-146.
7. Bourgin J.P., Nitsch J.P.: Production of haploids *Nicotiana* from excised stamens. *Annales de Physiologie Vegetale*, 1967, **9(9)**: 377-382.
8. Chaplin J.F., Mann T.J.: Interspecific hybridization, gene transfer and chromosomal substitution in *Nicotiana*. *North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin*, 1961, **128**: 1-31.
9. Clausen R.E., Goodspeed T.H.: Interspecific hybridization in *Nicotiana*. II. A tetraploid glutinosa-tabacum hybrid, an experimental verification of Winge's hypothesis. *Genetics*, 1925, **10**: 278-284.
10. Cuencá J., Aleza P., Juárez J., Pina J.A., Navarro L.: Mandarin: A new citrus mid-late triploid hybrid. *HortScience*, 2010, **45(6)**: 977-980.
11. Czubačka A., Doroszevska T.: Uzyskiwanie transgenicznych linii podwojonych haploidów tytoniu metodą kultur tkankowych. *Biotechnologia*, 2004, **2(65)**: 16-24.
12. Dark S.O.S.: The use of polyploidy in hop breeding. Department of Hop Research. Annual Report, Wye College, University of London, 1952, p. 34-42.
13. Dhooche E., Van Laere K., Eeckhaut T., Leus L., Van Huylenbroeck J.: Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2011, **104**: 359-373.
14. Doroszevska T.: Studia nad mieszańcami międzygatunkowymi *Nicotiana tabacum* L. × *Nicotiana africana* Merxm. Praca doktorska, IUNG w Puławach, AR w Lublinie, 1994.
15. Doroszevska T.: Możliwości transferu czynników odporności na nekrotyczny szczep ziemniaczanego wirusa Y (PVY<sup>NZ</sup>) od *Nicotiana africana* Merxm. do tytoniu uprawnego. *Mat. II Kraj. Symp.: „Odporność roślin na choroby, szkodniki i niesprzyjające czynniki środowiska”*. IHAR Radzików, 1995, ss. 77-79.
16. Doroszevska T., Berbeć A.: Cytogenetical investigation of poliploid interspecific hybrids of *Nicotiana africana* with different cultivars of *N. tabacum*. *Journal of Genetics and Breeding*, 2000, **54**: 77-82.
17. Doroszevska T.: Transfer of tolerance to different *Potato virus Y* (PVY) isolates from *Nicotiana africana* Merxm. to *Nicotiana tabacum* L. *Plant Breeding*, 2009, **129**: 76-81.
18. El-Morsy S.I., Dorra M.D.M., Elham A.A.A.E.H., Atef A.A.H., Ahmed Y.M.: Comparative studies on diploid and tetraploid levels of *Nicotiana alata*. *Academic Journal of Plant Sciences*, 2009, **2**: 182-188.
19. Gajos Z.: Próby wykorzystania mieszańców *Nicotiana tabacum* L. × *Nicotiana otophora* Gris. w hodowli tytoniu odpornego na *Peronospora tabacina* Adam (PT-2) i inne choroby (in Polish). *Biuletyn Informacyjny Centralnego Laboratorium Przemysłu Tytoniowego*, 1979, **1-2**: 11-23.
20. Gajos Z.: Przeniesienie odporności na wirus brązowej plamistości pomidora (Tomato Spotted Wilt Virus) z *Nicotiana alata* Link. et Otto. do tytoniu szlachetnego przez skrzyżowanie obu gatunków (in Polish). *Biuletyn Informacyjny Centralnego Laboratorium Przemysłu Tytoniowego*, 1981, **1-2**: 3-24.
21. Gerhäuser C.: Broad spectrum antiinfective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of the hop constituents and xanthohumol metabolites. *Molecular Nutrition Food Research*, 2005, **49(9)**: 827-831.

22. Grabowska-Jaochimiak A., Śliwińska E., Pigula M., Skomra U., Joachimiak A.J.: Genome size in *Humulus lupulus* L. and *H. japonicus* Siebold and Zucc. [Cannabaceae]. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, Tow. Bot., 2006, **75**: 207-2014.
23. Grant V.: Plant speciation. Columbia University Press: New York, NY, USA, 1981, pp. 564.
24. Hamada K., Inoue M., Tanaka A., Watanabe H.: Potato Virus Y – resistance in the progeny of haploid mutants obtained by the culture of *Nicotiana tabacum* L. anthers exposed to ion beams. Plant Biotechnology, 2001, **18**: 251-257.
25. Haunold A.: Cytology, sex expression, and growth of a tetraploid x diploid cross in hop (*Humulus lupulus* L.). Crop Science, 1971, **11**: 868-871.
26. Haunold A.: Polyploidy breeding with hop *Humulus lupulus* L. Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas, 1972, **9(1)**: 36-40.
27. Haunold A., Likens S.T., Horner C.E., Nickerson G.B., Zimmermann C.E.: Columbia and Willamette, two new aroma-type hop varieties. Brewers Digest, 1977, **52(11)**: 36-39.
28. Haunold A., Nickerson G.B.: Hop yield stimulation by triploid males under field conditions. Science, 1979, **19**: 27-31.
29. Haunold A., Nickerson G.B., Gampert U., Kling D., Kenny S.T.: Liberty and Crystal – Two new U.S.-developed aroma hops. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 1995, **53**: 9-13.
30. Hildebrand R.P., Kavanagh T.E., Clarke B.J.: Hop lipids and beer quality. Brewers Digest, 1975, **50**: 58-60.
31. Kostoff D.: Studies on polyploid plants. XVIII. Cytogenetic studies on *Nicotiana sylvestris* × *N. tomentosiformis* hybrids and amphidiploids and their bearings on the problem of the origin of *N. tabacum*. Crit. Rev. Acad. Sci., 1938, **18**: 459-462.
32. Kostoff D.: Cytogenetics of the genus *Nicotiana*. State Printing House, Sofia, 1943, pp. 1071.
33. Krájl D.: Diploid and tetraploid crossing of hop (*Humulus lupulus* L.). Kmetijstvo, 1973, **21**: 155-174.
34. Krájl D.: Diploid and polyploid breeding with hop. EUCARPIA Meeting Section on Mutation and Poliploidy, Novi Sad, 1976.
35. Laskowska D., Berbeć A.: Cytology and fertility of viable hybrids of *Nicotiana tabacum* L. cv. TB-566 with *N. alata* Link et Otto. Journal of Applied Genetics, 2005, **46**: 11-18.
36. Laskowska D., Berbeć A.: TSWV resistance in DH lines of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from a hybrid between ‘Polalta’ and ‘Wiślica’. Plant Breeding, 2010, **129**: 731-733.
37. Lloyd R.: Tissue culture as a means of circumventing lethality in an interspecific *Nicotiana* hybrid. Tobacco Science, 1975, **19**: 4-6.
38. Mansouri H., Bagheri M.: Induction of polyploidy and its effect on *Cannabis sativa* L. In: Botany and biotechnology, S. Chandra, H. Lata, M. El Sohly (eds). Springer: Cham, Switzerland, 2017, pp. 365-383.
39. Moutschen-Dahmen J., Moutschen-Dahmen M.: Radiation Induced Polyploidy in *Nigella damascena*. Caryologia, 1970, **23**: 501-513.
40. Murashige T., Nakano R.: Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploidy plants. Journal of Heredity, 1966, **57**: 115-118.
41. Patzak J., Hencychová A.: Hop breeding and composition of hop varieties around the world. Published by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Prague 2016, p. 45-50.
42. Probasco G., Varnum S., Hysert D.: Millennium-a new hop variety. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2006, **64**: 155-157.
43. Ramsey J., Schemske D.W.: Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 1998, **29**: 467-501.
44. Roborgh R.H.J.: The Production of seedless varieties of hop (*Humulus lupulus*) with colchicine. New Zealand Journal of Agricultural Research 1969, **12**: 256-259.

45. Roy A.T., Leggett G., Koutoulis A.: *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Cell Reports, 2001, **20**: 489-495.
46. Sattler M.C., Carvalho C.R., Clarindo W.R.: The polyploidy and its key role in plant breeding. Planta, 2016, **243**: 281-296.
47. Shahadati-Moghaddam Z., Hosseini A., Soorni J., Trojak-Goluch A.: Development of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) doubled haploids lines resistant to potato virus Y<sup>o</sup>. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, 2016, **76(3)**: 333-340.
48. Simmonds N.W.: Polyploidy in plant breeding. SPAN, 1980, **23**: 73-75.
49. Škof S., Bohanec B., Kastelec D., Luthar Z.: Spontaneous induction of tetraploidy in hop using adventitious shoot regeneration method. Plant Breeding, 2007, **126(4)**: 416-421.
50. Skomra U., Przybyś M., Trojak-Goluch A.: Kierunki badań naukowych wspierające doskonalenie genotypów chmielu. Studia i Raporty IUNG-PIB, 2012, **31(5)**: 21-37.
51. Šmalcelj B., Čurković Perica M.: Development of Anther-Derived Flue-Cured Tobacco Dihaploids from PVY Resistant DH10 Hybrid. Die Bodenkultur, 2000, **51(1)**: 11-17.
52. Stebbins G.L.: Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnolds Publ.: London, UK, 1971, p. 43-46.
53. Švećarová M., Navrátilová B., Hašler P., Ondřej V.: Artificial induction of tetraploidy in *Humulus lupulus* L. using oryzalin. Acta Agrobotanica, 2019, **72**: 1764.
54. Tate J.A., Soltis D.E., Soltis P.S.: Polyploidy in plants. In: The evolution of the genome, T.R. Gregory (ed.). Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2005, pp. 371-426.
55. teBeest M., LeRoux J.J., Richardson D.M., Brysting A.K., Suda J., Kubešová M., Pyšek P.: The more the better? The role of poliploidy in facilitating plant invasions. Annals of Botany, 2012, **109**: 19-45.
56. Ternovsky M.F.: Die Fragen der Immunitat bei Vertretern der Gattung *Nicotiana*. Der Zuchter, 1934, **6**: 140-144.
57. Trojak-Goluch A., Berbeć A.: Cytological investigations of the interspecific hybrids of *Nicotiana tabacum* L. × *N. glauca* Grah. Journal of Applied Genetics, 2003, **44**: 45-54.
58. Trojak-Goluch A., Berbeć A.: Meiosis and fertility in interspecific hybrids of *Nicotiana tabacum* L. × *N. glauca* Grah. and their derivatives. Plant Breeding, 2007, **126(2)**: 201-206.
59. Trojak-Goluch A., Berbeć A.: Resistance to black root rot (*Chalara elegans* Nag. Raj and Kendrick) and some growth characteristics in doubled haploid derivatives of the F<sub>1</sub> hybrid of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Polish Journal of Agronomy, 2009, **1**: 52-55.
60. Trojak-Goluch A., Skomra U.: Artificially induced polyploidization in *Humulus lupulus* L. and its effect on morphological and chemical traits. Breeding Science, 2013, **63**: 393-399.
61. Trojak-Goluch A., Kawka M., Czarnicka D.: The effects of explant source and hormone content on plant regeneration and induction of tetraploids in *Humulus lupulus* L. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 2015, **51**: 152-159.
62. Trojak-Goluch A., Laskowska D., Kursa K.: Morphological and chemical characteristics of doubled haploids of flue-cured tobacco combining resistance to *Thielaviopsis basicola* and TSWV. Breeding Science, 2016, **66**: 293-299.
63. Trojak-Goluch A.: Regeneracja pędów i stopień ploidalności roślin uzyskanych w kulturach *in vitro* fragmentów walca osiowego haploidalnych łodyg tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.). Polish Journal of Agronomy, 2020, **41**: 3-10.
64. Trojak-Goluch A., Skomra U.: Ploidy variation and agronomic performance of F<sub>1</sub> hybrids of tetraploid and diploid forms of *Humulus lupulus* L. Breeding Science, 2020, **70**: 176-182.
65. Walker D.R., Aycock M.K.: Development of anther-derived dihaploids to combine disease resistance in Maryland tobacco. Crop Science, 1994, **34(2)**: 335-338.



66. W a r m k e H.E., Blakeslee A.F.: Induction of tetraploidy in *Nicotiana sanderae* and in the sterile hybrid *N. tabacum* × *N. glutinosa*. *Genetics*, 1939, **24**: 109-110.
- 

Adres do korespondencji:

*mgr Magdalena Kawka-Lipińska; dr hab. Anna Trojak-Goluch*  
*Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin*  
*IUNG-PIB*  
*ul. Czartoryskich 8*  
*24-100 Puławy*  
*tel.: 81 4786 934; 81 4786 933*  
*e-mail: Magdalena.Kawka@iung.pulawy.pl;*  
*Anna.Trojak-Goluch@iung.pulawy.pl;*

---

AUTOR	ORCID
Magdalena Kawka-Lipińska	0000-0003-1039-5280
Anna Trojak-Goluch	0000-0002-5191-4414

**Anna Trojak-Goluch, Magdalena Kawka-Lipińska**

*Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy  
w Puławach*

GŁÓWNE ALKALOIDY TYTONIU – CHARAKTERYSTYKA,  
PRZEMIANY W ROŚLINIE ORAZ WYZWANIA DLA HODOWLI ROŚLIN\*

**Słowa kluczowe:** nikotyna, nornikotyna, tytoń szlachetny, biosynteza, hodowla mutacyjna, interferencja RNA

---

### Wstęp

Alkaloidy to naturalnie występujące w przyrodzie związki organiczne, głównie pochodzenia roślinnego, charakteryzujące się obecnością jednego lub więcej atomów azotu zazwyczaj w pierścieniach heterocyklicznych. Obecnie znanych jest ponad kilka tysięcy tego typu związków. Stanowią one zróżnicowaną strukturalnie grupę produktów występujących zarówno w postaci wolnych zasad, rozpuszczalnych w wodzie soli kwasów organicznych, estrów, jak i w połączeniu z taninami czy cukrami. Wykazują właściwości zasadowe i mają silne oddziaływanie na organizmy ludzkie i zwierzęce, co tłumaczy się ich strukturalnym podobieństwem do ważnych związków sygnałowych (neuroprzekazników), takich jak: dopamina, acetylocholina, noradrenalina i serotonina (44). Wiele z nich stanowi składniki leków i środków farmaceutycznych wykazujących działanie rozkurczowe, znieczulające, przeciwbólowe, przeciwkaszlowe, przeciwreumatyczne, żółciopędne, przeciwzapalne i przeciwgorączkowe. Znaczna część alkaloidów przejawia również właściwości antybakteryjne i przeciwgrzybicze (46). Istnieje wiele doniesień wskazujących, że są one produktami ubocznymi procesów metabolicznych roślin. Pełnią również rolę „broni chemicznej” przed patogenami i szkodnikami (60). Ze względu na swój gorzki smak ograniczają lub uniemożliwiają owadom żerowanie na roślinach. Niektóre z nich są toksyczne dla owadów lub zaburzają ich rozwój i zdolności rozrodcze. Podkreśla się również ich działanie stymulujące i regulujące w procesie wzrostu, metabolizmu i reprodukcji roślin (6). Alkaloidy mogą stanowić prekursorzy do produkcji białek i brać udział

---

\*Opracowanie wykonano w ramach zadania 6.3 pt. „Upowszechnianie wiedzy o wynikach uzyskiwanych w ramach realizacji zadania (hodowla i nasiennictwo chmielu i tytoniu)” z dotacji budżetowej przeznaczonej na realizację zadań MRiRW w 2022 r.

w procesie formowania nasion. Dodatkowo odgrywają rolę w detoksykacji szkodliwych czynników poprzez metylowanie, kondensację i cyklizację związków, których nagromadzenie w komórkach prowadzi do uszkodzenia rośliny. Produkowane są najczęściej w asymilujących częściach roślin, a kumulowane zazwyczaj w liściach, owocach, nasionach, kwiatach, korzeniach i korze (61).

Oszacowano, że niemal jedna czwarta roślin wyższych zawiera w swym składzie alkaloidy. Szczególnie bogate w te związki są gatunki z rodziny *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, a także *Solanaceae* (44). W obrębie rodziny *Solanaceae* ważnym źródłem alkaloidów jest tytoń szlachetny (*Nicotiana tabacum* L). Ten pochodzący z Ameryki Południowej i Meksyku gatunek zawiera szereg alkaloidów, które wykazują silne działanie fizjologiczne na ludzi i zwierzęta. Stosowane w niewielkich dawkach działają pobudzająco na receptory cholinergiczne odpowiedzialne za przesyłanie impulsów nerwowych, wzmagają aktywność ruchową, stymulują pracę gruczołów wydzielniczych. Większe dawki alkaloidów mogą powodować nudności, wymioty, zaburzenia rytmu serca, porażenie układu oddechowego i nerwowego oraz powstawanie procesów nowotworowych (44). Pod względem budowy chemicznej wszystkie alkaloidy tytoniowe są pochodnymi pirydyny – heterocyklicznego związku chemicznego z grupy azyn o aromatycznym, sześcioczołowym pierścieniu zawierających co najmniej jeden atom azotu. Część z nich w swej strukturze chemicznej zawiera także pierścienie piperydynowy lub pirolidynowy powstałe w wyniku cyklizacji i dekarboksylacji aminokwasów białkowych, takich jak: lizyna, ornityna, prolina czy kwas glutaminowy (77). Do najważniejszych alkaloidów tytoniowych należą: nikotyna, nornikotyna, anabazyna, anatabina, miozmina i kotynina. Dominującym związkiem stanowiącym od 90 do 95% ogólnej puli alkaloidów jest nikotyna (77). Jej obecność w liściach w uznanych granicach jest korzystna i oczekiwana, sprzyja bowiem podniesieniu jakości surowca tytoniowego. Pozostałe alkaloidy stanowią od 5 do 10% całkowitej zawartości alkaloidów, przy czym w niektórych odmianach uprawnych dominuje nornikotyna. Obecność tego alkaloidu w tytoniu jest wysoce niepożądana, gdyż stanowi on prekursor związków potencjalnie rakotwórczych (32).

Niniejsze opracowanie przedstawia charakterystykę właściwości fizycznych, chemicznych i biologicznych nikotyny oraz nornikotyny, jak również etapy biosyntezy tych związków. Omówiono także wyzwania stojące przed hodowcami tytoniu w związku z opublikowanymi w 2015 r. rekomendacjami Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) dotyczącymi profilu alkaloidowego surowca tytoniowego.

### **Właściwości fizyczne i chemiczne nikotyny**

Pierwsze wzmianki o występowaniu pobudzającej substancji w liściach tytoniu pochodzą z XVII wieku. Od tego czasu poznano jej budowę chemiczną, właściwości fizyczne i aktywność biologiczną. Nikotyna ma postać bezbarwnej, oleistej i ciemniejącej na powietrzu cieczy. Chemicznie czysta nikotyna jest prawie bezwonna,

natomiast charakteryzuje się ostrym, długo utrzymującym się smakiem. Jej temperatura wrzenia wynosi 246–247°C, jednakże zaczyna ulatniać się w znacznie niższej temperaturze. Rozpuszcza się dobrze w większości rozpuszczalników organicznych, a także w wodzie o temperaturze poniżej 60°C (70). Jest związkiem heterocyklicznym powstałym w wyniku połączenia sześcioczłonowego pierścienia pirydyny i pięcioczłonowego pierścienia pirolu, którego atom węgla w pozycji 2 stanowi centrum chiralne. Znane są dwa izomery optyczne nikotyny, tj. L-nikotyna i D-nikotyna, różniące się kierunkiem skręcania światła spolaryzowanego. W komórkach roślinnych alkaloid ten występuje najczęściej w połączeniu z kwasami jabłkowym i cytrynowym, tworząc sole, poza tym może być związany z garbnikami i żywicami (45). Jest związkiem chemicznym o silnym działaniu psychoaktywnym i uzależniającym (45).

### Biosynteza nikotyny w tytoniu szlachetnym

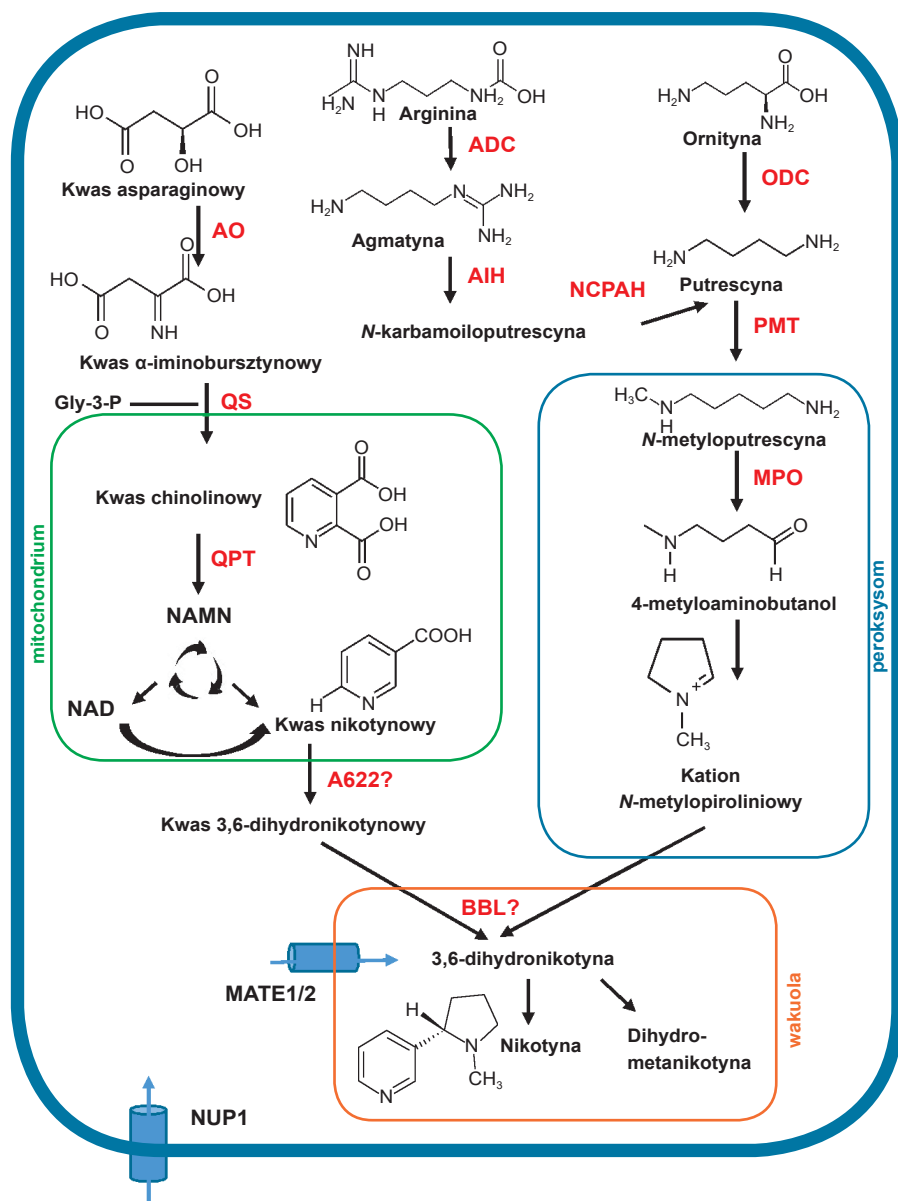
Biosynteza nikotyny jest procesem złożonym, kontrolowanym przez dwa niepowiązane ze sobą genetyczne *loci* *NICI* i *NIC2* warunkujące produkcję enzymów katalizujących reakcje dwóch niezależnych szlaków metabolicznych prowadzących do powstania pierścienia pirolidynowego i pierścienia pirydynowego (66). Substratem w szlaku prowadzącym do powstania pierścienia pirolidynowego jest putrescyna (rys. 1), która może być wytwarzana dwiema alternatywnymi drogami: bezpośrednio z ornityny w wyniku działania dekarboksylazy ornitynowej (ODC) lub pośrednio z argininy (83). W metodzie pośredniej arginina jest dekarboksylowana do agmatyny z udziałem dekarboksylazy argininowej (ADC). Następnie podlega hydrolizie do *N*-karbamoilputrescyny przez iminohydrolazę agmatyny (AIH), a potem do putrescyny przez amidohydrolazę *N*-karbamoilputrescyny (NCPAH) (37). Dalej putrescyna jest przekształcana do *N*-metyloputrescyny przez *N*-metylotransferazę putrescyny (PMT). Wreszcie, *N*-metyloputrescyna jest deaminowana oksydacyjnie przez oksydazę *N*-metyloputrescyny (MPO) do 4-metyloaminobutanalu, który spontanicznie cyklizuje, tworząc kation *N*-metylopiroliniowy. Kation *N*-metylopiroliniowy stanowi substrat do tworzenia pierścienia pirolidynowego. Katalizatorem reakcji jest syntaza nikotyny (SN) (8).

Szlak syntezy pierścienia pirydynowego nikotyny rozpoczyna się od kwasu L-asparaginowego, który jest utleniany przez oksydazę L-asparaginianową (AO) do kwasu  $\alpha$ -iminobursztynowego. W kolejnym etapie 3-fosforan aldehydu glicerynowego przy udziale syntazy chinolinowej (QS) kondensuje z kwasem  $\alpha$ -iminobursztynowym, tworząc kwas chinolinowy (17). Następnie kwas chinolinowy jest przekształcany do NAMN (mononukleotydu niacyny) przez kluczowy w syntezie wielu alkaloidów enzym fosforybozylotransferazę kwasu chinolinowego QPT (83). NAMN może być przekształcony w kwas nikotynowy albo bezpośrednio przez glikohydrolazę NAMN, albo poprzez wieloetapowy proces obejmujący syntezę i degradację koenzymu NAD (dinukleotydu nikotynamidowo-adeninowego) (74, 75, 76).

W ostatnim etapie syntezy nikotyny prekursor – kwas nikotynowy jest redukowany początkowo do kwasu 3,6-dihydronikotynowego (47, 48), następnie ulega dekarboksylacji i sprzężeniu z substratem *N*-metylopiroliniowym. W kondensacji pierścienia pirolidyny i pirydyny pośredniczą dwie oksydoreduktazy A622 oraz białka BBL (ang. *berberine bridge enzyme-like*). Jednak dokładny przebieg finalnego etapu biosyntezy nikotyny, jak również skład i budowa enzymów w to zaangażowanych pozostają wciąż niewyjaśnione (18, 42). Nowo zsyntetyzowana nikotyna jest transportowana do wakuoli przez zlokalizowane w tonoplastach transportery (65).

Jak wykazały badania Chaze (12) oraz Fardy i in. (24) prowadzone z wykorzystaniem technik histochemicznych, głównym miejscem syntezy alkaloidów są komórki kory usytuowane w wierzchołkowej części korzeni. Zastosowanie szczepienia komercyjnej odmiany pomidora na podkładkach *N. tabacum* ‘Samsun’ zaowocowało pojawieniem się znacznych ilości nikotyny w liściach pomidora (30). Również eksperymenty z zastosowaniem kultur komórkowych szeregu gatunków z rodzaju *Nicotiana* potwierdziły, że bazowym miejscem syntezy alkaloidów tytoniowych są korzenie. Flores i Filner (25) podają, że w kulturach korzeni i włośników *N. tabacum* odnotowano intensywną syntezę nikotyny (3% s.m.), podczas gdy hodowle kalusa oraz zawiesin komórkowych pozyskanych z liści *N. tabacum* ‘Wisconsin 38’ produkowały śladowe ilości tego związku (71).

Większość wyprodukowanej w korzeniach nikotyny jest transportowana ksylemem do liści, kwiatów i nasion, gdzie ulega nagromadzeniu w wakuolach komórkowych. Translokacja nikotyny odbywa się z uwagi na to, że wysoki jej poziom w korzeniach powoduje hamowanie zwrotne ekspresji genów zaangażowanych w syntezę alkaloidu. Utrzymywanie niskiego stężenia nikotyny w cytoplazmie komórek korzeni jest istotne dla zapewnienia jej ciągłej produkcji (77). Z kolei jej sekwestracja w wakuolach komórkowych liści jest swego rodzaju roślinną strategią detoksykacji alkaloidów i ochrony komórek przed zatruciem (65). W translokację i akumulację endogennej nikotyny zaangażowanych jest kilka transporterów z rodziny MATE (ang. *multidrug and toxic compound extrusion*), jak również z rodziny permeaz wychwyty puryny. Transportery typu MATE, w tym NtMATE1 i NtMATE2, to rozmieszczone w komórkach korzeni białka wykorzystujące antyport protonów z wakuoli do przemieszczania cytoplazmatycznej nikotyny przez tonoplast komórek korzenia (65). Z kolei transporter Nt-JAT1 jest zaangażowany w wakuolarną akumulację nikotyny w nadziemnych częściach roślin tytoniu w liściach, lokalizuje się w tonoplastcie i wykazuje aktywność antyportu nikotynowo-protonowego. Nt-JAT1 może funkcjonować w procesie wypływu nikotyny z komórek i ładowania jej do ksylemu w korzeniach.



Rys. 1. Szlaki metaboliczne prowadzące do biosyntezy nikotyiny w komórkach korzeni *Nicotiana tabacum* L. Czerwoną czcionką oznaczono enzymy uczestniczące w poszczególnych etapach szlaku, NAMN – mononukleotyd kwasu nikotynowego, NAD – dinukleotyd nikotyinoamidoadeninowy, NCPAH – aminohydrolaza *N*-karbamoiloputrescyny, AIH – iminohydrolaza agmatyny, PMT – *N*-metylotransferaza putrescyny, MPO – oksydaza *N*-metyloputrescyny, AO – oksydaza asparaginianowa, QS – syntaza kwasu chinolinowego, QTP – fosforybozylotransferaza chinolinianowa, ADC – dekarboksylaza argininowa, ODC – dekarboksylaza ornityny, BBL – enzymy mostka berberynowego, A622 – oksydoreduktazy, MATE1/2, NUP1 – transportery nikotyiny

Źródło: Zenkner i in., 2019 (83); Dewey i Xie, 2013 (19)

Kolejny transporter Nt-JAT2 został zidentyfikowany jako transporter nikotyny w liściach. Nt-JAT2 lokalizuje się w tonoplaście i bierze udział w transporcie nikotyny do światła wakuoli specyficznie w liściach (58). Wreszcie rozmieszczony w błonie plazmatycznej tytoniu transporter (białko) z rodziny permeaz wychwytu nikotyny 1 (NUP 1) zaangażowany jest w wychwytywanie puryn i zapobieganie utracie nikotyny z apoplastu. NUP1 wykorzystuje symport protonowy do wychwytu nikotyny (35). Ekspresja NUP1 zachodzi głównie w komórkach epidermalnych wierzchołków korzeni, chociaż niską ekspresję wykryto także w liściach i łodygach roślin tytoniu. NUP1 może zapobiegać utracie nikotyny z apoplastu, a nawet pobierać wydzieloną nikotyne z powrotem do tkanek korzenia (43). NUP1 funkcjonuje w celu utrzymania preferowanej homeostazy nikotyny w komórkach korzenia poprzez regulowane uwalnianie i resorpcję nikotyny pomiędzy komórkami korzenia a ryzosferą (19). Sugerowano również, że transporter NUP1 może importować nikotyne z ksylemu do komórek liścia (39). Wciąż nierozpoznane są transportery odpowiedzialne za wprowadzenie nikotyny do ksylemu w korzeniach, jak również uwolnienie nikotyny z ksylemu do komórek liści.

### Regulacja zawartości nikotyny w tytoniu

Każda część rośliny tytoniu zawiera nikotyne. Jak podaje Weeks i Bush (78), niewielkie ilości tego związku można wykryć nawet w dojrzałych nasionach. Znaczny wzrost koncentracji nikotyny i innych alkaloidów notuje się wraz z kiełkowaniem nasion i wzrostem wydłużeniowym korzenia. Czynniki modyfikującymi kumulację nikotyny na tym etapie rozwoju mogą być temperatura otoczenia i światło. Doświadczenia wykazały, że największą akumulację nikotyny ( $2588 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  s.m.) uzyskano w siewkach utrzymywanych przez 144 godziny w temperaturze  $27^\circ\text{C}$ , a najmniejszą ( $51 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  s.m.) w siewkach poddanych działaniu temperatury  $16^\circ\text{C}$  przez ten sam okres czasu. Gromadzeniu nikotyny w siewkach sprzyja również początkowa 8-godzinną fotoindukcja nasion, a następnie utrzymywanie ich w ciemności. Wraz ze wzrostem tytoniu wzrasta także produkcja nikotyny w roślinie. Największa jej ilość jest wytwarzana po osiągnięciu przez rośliny faz pąkowania i kwitnienia. Rozmieszczenie nikotyny w poszczególnych organach jest mocno zróżnicowane. Większość nikotyny jest magazynowana w liściach. Nieco mniej alkaloidu gromadzi się w kwiatach, a znacznie mniej w łodygach i korzeniach. Poziom nikotyny w liściach tytoniu jest także uzależniony od położenia na łodydze (69). Djordjevic i in. (20) podają, że liście tytoniu Virginia pozyskane z dolnej części rośliny zawierają niemal dwukrotnie mniej nikotyny niż liście zebrane z jej wierzchołka (odpowiednio:  $37,37 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  i  $60,37 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  s.m.). Również rozmieszczenie nikotyny w blaszce liściowej nie jest równomierne. Najwięcej alkaloidu jest w brzeżnej części blaszki liściowej, a najmniej u podstawy i w końcowym fragmencie liścia (7, 9). Różnice w rozmieszczeniu nikotyny między segmentami liścia tytoniu ciemnego suszonego powietrzem 'KY171'

mogą wynosić nawet  $43,04 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  s.m. (7). Inni autorzy badający zmiany zawartości nikotyny w poszczególnych częściach rośliny zauważyli, że najbogatsza pod tym względem jest skórka liści, a następnie miękisz gąbczasty liści. Nieco mniej nikotyny zawiera kora pierwotna korzeni, skórka i tkanka miękiszowa łodygi oraz miękisz palisadowy liści. Małe ilości nikotyny zawierają nerwy liści i rdzeń łodygi. Najmniej alkaloidu stwierdzono natomiast w walcu osiowym korzeni (56). Decydujący wpływ na produkcję i gromadzenie nikotyny w liściach tytoniu wywierają jednak właściwości genetyczne odmian i przynależność do typu użytkowego. Pośród różnych typów użytkowych tytoń orientalny i odmiana Maryland mają na ogół niską zawartość nikotyny stanowiącą od 0,3 do 1% s.m. Z kolei tytoń typu Virginia odznacza się zawartością nikotyny od niskiej do średniej (1–2,5%). Liście odmian kubańskich, tytoniu typu Burley, mają średnią zawartość nikotyny (3–4% s.m.). W przypadku niektórych odmian należących do tytoniu ciemnego (typ Mocny Skroniowski) zawartość nikotyny może wynosić 4–5% (2, 21, 56).

Oprócz czynników genetycznych zawartość nikotyny w liściach tytoniu pozostaje pod dużym wpływem czynników środowiska, takich jak: wilgotność gleby, temperatura czy nasłonecznienie. Nadmierne opady wpływają niekorzystnie na akumulację azotu, a w efekcie nikotyny w roślinie, głównie z powodu wymywania pierwiastka z gleby (73). Z kolei mała ilość opadów atmosferycznych w sezonie wegetacyjnym sprzyja akumulacji nikotyny w liściach (4). Łagodny stres suszy prowadzi bowiem do wzmożonej produkcji kwasu jasmonowego będącego stymulatorem produkcji metabolitów wtórnych, w tym nikotyny. Dodatkowo zaobserwowano, że u odmian typu Virginia zmiany stężenia nikotyny są zwykle mniej związane z wahaniami wilgotności gleby, natomiast w przypadku odmian typu papierosowego ciemnego wysoka lub niska wilgotność gleby wywiera zdecydowanie większy wpływ na syntezę i akumulację alkaloidów (79). Również temperatura gleby może modyfikować profil alkaloidowy tytoniu. Malik i in. (54) poddali strefę korzeniową tytoniu działaniu różnych temperatur: 12, 25, 30°C. Stwierdzili, że rośliny utrzymywane przez dwie doby w temperaturze 30°C odznaczały się zdecydowanie niższą zawartością nikotyny w korzeniach i wyższą zawartością tego alkaloidu w liściach w porównaniu z roślinami uprawianymi w temperaturach 12 i 25°C. Było to wynikiem obniżenia w korzeniu poziomu ekspresji genów warunkujących produkcję enzymów PMT i A622 uczestniczących w biosyntezie nikotyny, ale także zmian w transporcie i akumulacji nikotyny w liściach. Mechanizmy molekularne, za pomocą których stres temperaturowy zmienia ekspresję genów pozostają wciąż nieznane. Z danych zamieszczonych przez Tso i in. (72) wynika, że zawartość nikotyny w tytoniu może rosnąć wraz ze wzrostem nasłonecznienia roślin. W wyniku wydłużenia fotoperiodu z 8 do 16 godzin odnotowano zwiększoną zawartość nikotyny w liściach (odpowiednio z  $5,28$  do  $19,80 \text{ mg} \cdot \text{roślin}^{-1}$ ).

Poziom i skład alkaloidów tytoniowych w znacznym stopniu zależą od zasobności stanowiska. Gleby żyzne, z dużą zawartością materii organicznej, sprzyjają



gromadzeniu nikotyny w liściach. Równie ważnym czynnikiem jest nawożenie mineralne roślin. Odpowiednie zaopatrzenie w składniki pokarmowe intensyfikuje wzrost systemu korzeniowego i części nadziemnej roślin, co przekłada się na wzrost parametrów chemicznych liści. Jednym z najważniejszych składników mineralnych wpływającym na poziom nikotyny w liściach jest azot (N) (15). Efektywność nawożenia tym pierwiastkiem jest znacznie bardziej zauważalna w porównaniu z działaniem innych składników mineralnych, ale pierwiastek ten musi być stosowany w umiarkowanych dawkach. Nadmiar N może opóźnić dojrzewanie liści i obniżyć jakość plonu (73). Zrównoważone zaopatrzenie roślin w ten pierwiastek sprzyja prawidłowemu rozwojowi roślin i intensywnej biosyntezie nikotyny w korzeniach. Drake i in. (23) stosowali różne dawki azotu (75, 100, 125%) w 5 terminach wzrostu tytoniu Virginia (tj. 0, 2, 4, 6, 8 tygodni po sadzeniu roślin). Uzyskali porównywalnie wysoką zawartość alkaloidów w liściach (>2,75% s.m.), stosując standardowo zalecaną dawkę N (100%) rozłożoną równomiernie w trakcie sezonu wegetacyjnego podobnie jak po aplikacji 125% zalecanej dawki podanej głównie przed sadzeniem rozsady i w początkowej fazie wzrostu roślin. Jak podaje Wilkinson i in. (80) oraz Tso (73), sposób aplikacji i rozmieszczenie nawozu azotowego ma również znaczący wpływ na stężenie nikotyny. Równomiernie rozproszone stosowanie nawozu zwykle powoduje ograniczone pobieranie azotu i w konsekwencji niższą zawartość nikotyny w liściach. Z kolei nawożenie zlokalizowane, pasowe, zwiększa pobieranie azotu, co prowadzi do zwiększenia zawartości nikotyny w roślinie (26). Drugim niezbędnym składnikiem pokarmowym oddziałującym na zawartość nikotyny w tytoniu jest potas (K). Zalecenia dotyczące optymalnych dawek nawożenia K różnią się w zależności od rodzaju gleby, pozostałości pierwiastka w glebie, terminu jego stosowania, a nawet w zależności od odmiany tytoniu. Z reguły rolnicy stosują duże dawki potasu – od 130 do 160 kg·ha<sup>-1</sup> w postaci K<sub>2</sub>O w celu uzyskania wysokich plonów, a także zapewnienia odpowiedniego poziomu składnika, zwłaszcza na glebach gruboziarnistych, podatnych na wymywanie. Zaobserwowano jednak, że nadmiernie wysoki poziom potasu w glebie wyraźnie ogranicza produkcję nikotyny w korzeniach (81). Zupełnie odmienna sytuacja jest w przypadku nawożenia fosforem. Jego zawartość w glebie nie wpływa zasadniczo na poziom nikotyny w liściach (53). Aczkolwiek Gaines i in. (27) podają, że wywołane w uprawie hydroponicznej niedobory podstawowych makroskładników, w tym fosforu, spowodowały obniżenie poziomu alkaloidów w porównaniu z obserwowanym w roślinach kontrolnych optymalnie zaopatrzonych w składniki pokarmowe. Również Henry i in. (33) zalecają, by unikać niedoborów fosforu, ponieważ mogą one intensyfikować negatywny wpływ pobierania azotu przez rośliny w okresie dojrzewania liści i w konsekwencji pogarszać profil alkaloidowy roślin.

Większość praktyk agrotechnicznych poprawiających zdrowotność roślin i wielkość plonów ma pozytywny wpływ na produkcję i akumulację alkaloidów. Wśród nich wymienia się między innymi sadzenie roślin. Wpływ wywiera zarówno termin

sadzenia, jak i wielkość sadzonek. Badania przeprowadzone przez Hawksa i in. (31) wykazały, że rośliny posadzone 2 tygodnie wcześniej niż zwykle miały najniższy poziom alkaloidów w czasie zbioru, podczas gdy rośliny posadzone 2 tygodnie później od zalecanego terminu miały znacznie wyższy poziom alkaloidów. Również Miner (57) wykazał wyższy poziom alkaloidów w roślinach posadzonych 4 tygodnie później niż zwykle. Z kolei Congleton i in. (16) nie zaobserwowali znaczących różnic w poziomie alkaloidów, gdy tytoń sadzono o 4–8 tygodni później niż zwykle. Autorzy nadmieniają jednak, że sadzonki wysadzone na polu po zalecanym terminie mają tendencję do przedwczesnego kończenia fazy wegetatywnej, co skutkuje przedwczesnym kwitnieniem, wytworzeniem na roślinie niewielkiej liczby liści z niską zawartością nikotyny. Gromadzeniu nikotyny w liściach służy uprawa roślin w szerokiej rozstawie. Małe zagęszczenie roślin sprzyja bowiem optymalnemu zaopatrzeniu w składniki pokarmowe, w tym związki azotowe, co skutkuje zwiększoną produkcją alkaloidów.

Jednym z ważniejszych zabiegów pielęgnacyjnych tytoniu, który wpływa korzystnie na skład chemiczny liści jest „ogławianie” roślin, czyli usuwanie kwiatostanu głównego. Zabieg ten ma na celu zatrzymanie asymilatów i produktów przemiany materii w liściach, dzięki czemu stają się większe i treściwsze (73). Dodatkowo praktyka ta wpływa znacząco na wzrost zawartości nikotyny w liściach (26). Uważa się, że usunięcie kwiatostanu znosi dominację wierzchołkową, pobudza wzrost korzeni, a dodatkowo uruchamia szlak sygnałowy kwasu jasmonowego (JA) (63). Aktywacja szlaku sygnałowego JA w liściach przyczynia się do wzrostu puli JA w korzeniach oraz ekspresji licznych genów zaangażowanych w reakcje obronne roślin. Białkowe produkty tych genów z kolei indukują produkcję nikotyny poprzez regulację enzymów zaangażowanych w biosyntezę alkaloidu, np.: PMT (5, 34). W efekcie notuje się wzrost zawartości nikotyny w liściach (1). Ustalenie optymalnej wysokości ogławiania jest dość trudne z powodu dużego zróżnicowania odmian komercyjnych pod względem liczby liści, jak również predyspozycji do produkcji alkaloidów. Z reguły pozostawienie na roślinie większej liczby liści skutkuje niższym stężeniem nikotyny, podczas gdy niskie ogławianie i pozostawienie na roślinie małej liczby liści prowadzi do wyższego stężenia nikotyny. Gršić i in. (29) badali wpływ wysokości ogławiania na zawartość nikotyny w liściach trzech odmian tytoniu papierosowego jasnego. Wykazali, że skrócenie pędu i pozostawienie na łodydze 17 zamiast 20 liści prowadzi do wzrostu koncentracji nikotyny średnio o 0,11%. Efekty niskiego ogławiania roślin w postaci wzrostu zawartości alkaloidów głównych są najwyraźniejsze w liściach środkowych i górnych (26). Zabieg ogławiania tytoniu można przeprowadzać w fazie pąkowania roślin, w okresie pojawiania się pierwszych różowych kwiatów lub podczas pełni kwitnienia. Stocks i Whitty (68) utrzymują, że termin usunięcia kwiatostanu wpływa znacząco na koncentrację alkaloidów w liściach. Najlepszym terminem ogławiania tytoni papierosowych jasnych (typy Virginia i Burley) rosnących na glebach piaszczysto-gliniastych jest początek kwitnienia.

Usunięcie pędu głównego przerywa dominację wierzchołkową i stymuluje rozwój pędów bocznych. Pędy boczne tytoniu, potocznie zwane pasynkami, wyrastają z pąków znajdujących się w kątach liści. Pozostawienie ich na roślinie oprócz wyraźnych strat w plonowaniu, o ok. 20–35%, powoduje spadek zawartości nikotyny w liściach (79). Tso (73) utrzymuje, że sposób usuwania odrostów bocznych wywiera znaczący wpływ na zawartość nikotyny. Efektem ręcznego niszczenia odrostów jest najczęściej wzrost koncentracji nikotyny w liściach. Natomiast użycie do tego celu chemicznych regulatorów wzrostu może przyczynić się do spadku jej zawartości. Po zastosowaniu hydrazylu maleinowego całkowita zawartość alkaloidów w roślinach spadła o 0,32% w porównaniu z notowaną u roślin, na których zabieg wykonano ręcznie. Zupełnie inaczej jest w przypadku niszczenia odrostów przy użyciu środków z grupy herbicydów. Ich stosowanie niekiedy wręcz sprzyja akumulacji alkaloidu. Jak wykazały badania Jones i Rideout (38), w wyniku stosowania flumetraliny w dawce 57 mg·roślinę<sup>-1</sup> stężenie nikotyny w liściach wyniosło 2,54%, podczas gdy po aplikacji dawki 91 mg·roślinę<sup>-1</sup> zawartość nikotyny wyniosła 3,12%.

Kolejnym zabiegiem wywierającym znaczący wpływ na poziom nikotyny w surowcu tytoniowym jest zbiór liści. Przed przystąpieniem do zbiorów należy ocenić dojrzałość technologiczną liści, tj. określić ich barwę, lepkość i ułożenie względem łodygi. Zbiór liści w odpowiedniej fazie jest ważny nie tylko z uwagi na osiągnięcie jak najlepszych cech fizycznych surowca, ale także parametrów chemicznych, w tym pożądanej koncentracji alkaloidów. Zbyt wczesne podrywanie liści skutkuje otrzymaniem surowca z dużą zawartością wody, białka i chlorofilu, a małą ilością składników aromatycznych i nikotyny. Z kolei zbiór nieco przejrzałych liści przyczynia się do uzyskania surowca z małą zawartością węglowodanów i zwiększonym poziomem nikotyny (29). Większa liczba zbiorów dostosowana do tempa dojrzewania liści na łodydze umożliwia uzyskiwanie surowca o pożądanej zawartości nikotyny w liściach. Warto zauważyć, że na zawartość alkaloidów tytoniu mogą wpływać także uszkodzenia powstałe podczas zbioru i przygotowanie liści do suszenia, jak również urazy spowodowane działaniem czynników atmosferycznych, np. gradu czy wiatru.

### **Nornikotyina – właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne**

Kolejnym metabolitem wtórnym produkowanym przez tytoń szlachetny i wiele dzikich gatunków z rodzaju *Nicotiana* jest nornikotyina. Pierwsze wzmianki literaturowe o nornikotyinie pochodzą z 1927 r., kiedy to Polonovscy opisali metodę jej uzyskiwania. Identyfikacja tego alkaloidu w tytoniu odbyła się w 1928 roku przez Ehrensteina. Dwa lata później Von Brown i Weissbach uzyskali nornikotyinę w warunkach laboratoryjnych w wyniku demetylacji nikotyny. Nornikotyina jest bezbarwną, higroskopijną, nieco oleistą cieczą o lekkim zapachu aminy, który jest mniej ostry niż zapach nikotyny. Rozpuszcza się w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych. Jest jednak mniej lotna niż nikotyina (55). Pod względem budowy chemicznej nornikotyina

jest bardzo podobna do nikotyny. Zawiera dwa pierścienie, pirydyny i pirolidyny, przy czym do atomu azotu pirolidyny zamiast grupy metylowej został przyłączony atom wodoru. Podobnie jak nikotyna, jest substancją optycznie czynną, która w roślinach występuje w formie izomerów optycznych (enancjomerów) (S), (R) i SR-nornikotyny, wykazujących podobne właściwości fizyczne i chemiczne. Ich proporcje w komercyjnych odmianach tytoniu są zróżnicowane. Najczęściej dominuje forma R, która w korzeniach stanowi 60–80%, a w liściach 50–80%. Alkaloid ten powstaje w wyniku oksydacyjnej N-demetylacji nikotyny w nornikotyne zarówno w liściach, jak i korzeniach roślin (11, 67).

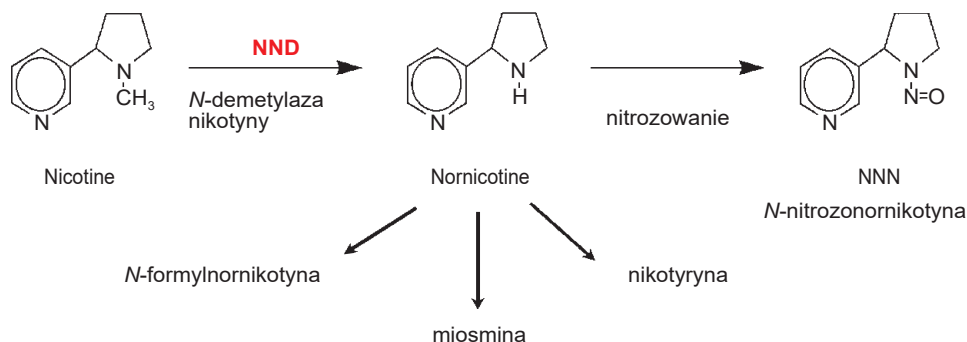
Przeprowadzone przez Blaima (3) badania sekwestracji nornikotyny przez *N. glutinosa* wykazały, że zawartość tego alkaloidu jest zmienna i uzależniona od wieku rośliny. Młode siewki są pozbawione nornikotyny. Natomiast starsze, 8-tygodniowe rośliny wykazują nieznaczny poziom tego alkaloidu, który wzrasta wraz ze wzrostem roślin. Nornikotyne z korzeni jest transportowana do najniższej położonych liści, z czasem trafia do tych z wyższych pięt. Stąd liście dolne zawierają największe ilości nornikotyny, a posiadają najmniej nikotyny. Natomiast liście środkowe, z mniejszą ilością nornikotyny, są zasobniejsze w nikotyne. Odnotowano także zróżnicowane rozmieszczenie nornikotyny w poszczególnych częściach blaszki liściowej. Brzegi liścia obfitują w nornikotyne, natomiast część środkowa jest niemal pozbawiona tego alkaloidu (3). Zawartość nornikotyny w tytoniu uprawnym waha się zazwyczaj od 2 do 5% ogólnej sumy alkaloidów (11). Znane są jednak odmiany tytoniu, w których nornikotyne stanowi nawet 95% ogółu alkaloidów. Należą do nich przede wszystkim odmiany zaliczane do typu użytkowego Burley, jak również do innych typów użytkowych, których liście suszone są na powietrzu. Natomiast większość odmian w typie Virginia charakteryzuje się niską zawartością nornikotyny (59, 67). Ilość nikotyny i nornikotyny oraz wzajemny stosunek zawartości tych dwóch substancji są wykorzystywane do oceny jakości tytoniu.

Nornikotyne wykazuje silne działanie na ludzi i zwierzęta. Uwalnia dopaminę w mózgu, przez co przyczynia się do wzmacniania działania nikotyny i przyspiesza proces uzależnienia. Jest uważana za jeden z najbardziej szkodliwych alkaloidów, ponieważ jest prekursorem specyficznej dla tytoniu N-nitrozonornikotyny (NNN), z grupy nitrozoamin tytoniowych (TSNA) (ang. *tobacco-specific nitrosamines*). Nitrozoaminy są odpowiedzialne za występowanie wielu nowotworów (32), zmieniają profil lipidowy krwi, powodując wzrost prawdopodobieństwa rozwoju miażdżycy i choroby wieńcowej. Dodatkowo obniżają poziom katalazy i dysmutazy nadtlenkowej, tj. enzymów biorących udział w niwelowaniu wpływu wolnych rodników na organizm człowieka. Testy farmakologiczne wykazały, że właściwości fizjologiczne nitrozonornikotyny zależą od optycznej formy jej występowania. Forma S-nitrozonornikotyny charakteryzuje się wyższą zdolnością akumulacji i wyższym poziomem toksyczności od formy R-nitrozonornikotyny (9).

## Biosynteza nornikotyny w tytoniu szlachetnym

W wyniku działania funkcjonalnych *N*-demetylaz nikotyny (NND) zgromadzona w komórkach tytoniu nikotyna ulega przemianom biochemicznym (rys. 2). Grupa metylowa pierścienia pirolidynowego zostaje zastąpiona atomem wodoru, a nikotyna przekształca się w nornikotyne. Produktem ubocznym tej reakcji jest CO<sub>2</sub>. Dowiedziono, że enzymy NND są kodowane przez grupę genów cytochromu P450 należących do podrodziny *CYP82E* (65). W *N. tabacum* występuje co najmniej pięć genów związanych z *CYP82E*. Są to: *CYP82E4*, *CYP82E5* i *CYP82E10*, które kodują funkcjonalne *N*-demetylasy nikotyny (10, 67, 51), jak również geny *CYP82E2* i *CYP82E3* kodujące enzymy nieaktywne (10). Badania dowiodły, że geny te znajdują się w niestabilnym locus sprzyjającym ich przemieszczaniu się, co w efekcie powoduje spontaniczne pojawianie osobników przekształcających nikotyne do nornikotyny (51). Stąd w populacjach odmian i linii hodowlanych, stabilnych pod względem wielu cech użytkowych, notuje się znaczne zróżnicowanie międzyosobnicze pod względem zawartości nikotyny i nornikotyny. Rośliny, które gromadzą nikotyne jako alkaloid główny nazywane są niekonwerterami, a te, u których znaczna część nikotyny przekształcana jest w nornikotyne, określane są jako konwertery. Wysoką frekwencję konwerterów obserwuje się przede wszystkim w odmianach należących do typu użytkowego Burley, w przypadku których proces suszenia prowadzony na powietrzu, w nieogrzewanych wiatach sprzyja oksydacyjnej *N*-demetylacji nikotyny. Mniejszy udział konwerterów notuje się natomiast wśród suszonych gorącym powietrzem odmian w typie Virginia, u których oddziaływanie wysokiej temperatury inaktywuje geny warunkujące przebieg konwersji (59).

Aktywność enzymów NND i efektywność konwersji nikotyny w nornikotyne są zróżnicowane i uzależnione od wielu czynników wewnętrznych, zewnętrznych, ale także fazy rozwojowej roślin. Według Chelvarajana i in. (13) czynnikiem wewnętrznym stymulującym aktywność NND może być podwyższony poziom NADH (dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego) w komórkach. Zastąpienie NADPH formą NADH zwiększa trzykrotnie wydajność konwersji nikotyny w nornikotyne. Z kolei czynnikiem zewnętrznym wydatnie ograniczającym wydajność procesu demetylacji może być wzrost temperatury otoczenia powyżej 30°C. Donaldson i Luster (22) utrzymują, że skutecznym inhibitorem demetylacji nikotyny jest także tlenek węgla, który blokuje działanie NND.



Rys. 2. Schemat przemian nikotyny w roślinach tytoniu szlachetnego

Źródło: Siminszky i in., 2005 (67); Cai, 2012 (9)

Ustalono również, że w roślinach tytoniu zachodzi metylacja nornikotyny do nikotyryny i nikotyny, jak również przekształcenie nornikotyny do miosminy. Leete (49) przez 8 dni podawał młodym roślinom tytoniu znakowaną ( $2\text{'-}^{14}\text{C}$ ) nornikotyę, a następnie dokonywał ekstrakcji i rozdzielania poszczególnych alkaloidów z roślin. Uzyskał nieznaczny stopień radioaktywności w nikotynie (0,047% pozyskanej nikotyryny) i znaczący poziom radioaktywności w miosminie (25,4%).

### Modyfikacje zawartości nikotyny i nornikotyny a hodowla tytoniu

Konsumpcja wyrobów tytoniowych wciąż pozostaje dużym wyzwaniem dla zdrowia publicznego na całym świecie. Wiele instytucji, w tym Światowa Organizacja Zdrowia (WHO), od lat prowadzi intensywną politykę antynikotynową, wskazując używanie wyrobów tytoniowych jako istotny czynnik ryzyka rozwoju wielu groźnych chorób. Choć nikotyryna nie jest rakotwórcza sama w sobie, wykazuje działanie uzależniające, a produkty jej przemiany są zaliczane do czynników rakotwórczych. W 2015 r. WHO opublikowała rekomendacje dotyczące obniżenia stężenia nikotyryny w krajance papierosowej do poziomu 0,04%. Uznano bowiem, że obniżenie zawartości składnika uzależniającego w surowcu i wyrobach tytoniowych może odegrać ważną rolę w koncepcji mającej na celu złagodzenie negatywnych skutków palenia tytoniu na poziomie światowej populacji.

Strategia redukcji zawartości nikotyryny w tytoniu może być realizowana z wykorzystaniem szeregu metod chemicznych, agrotechnicznych, prac hodowlanych oraz badań genetycznych. Ekstrakcja chemiczna nikotyryny z liści tytoniu pozwala zmniejszyć zawartość tego alkaloidu do bardzo niskiego poziomu, ale jednocześnie przyczynia się do zmniejszenia zawartości składników aromatycznych w surowcu. Z kolei uprawa odmian niskonikotyrynowych, jak również modyfikacje zabiegów agrotechnicznych, tj. zaniechanie ogławiania roślin i usuwania pędów bocznych tytoniu,

zmniejszenie dawki nawozów azotowych oraz zbiorów części liści z rośliny, oprócz ograniczenia zawartości nikotyny w liściach skutkują wyraźnym 25–50% spadkiem plonowania (33). Obniżenie potencjalnie kancerogennych związków w tytoniu może być prowadzone poprzez odpowiedni dobór form rodzicielskich do krzyżowania, a następnie selekcję osobników wykazujących niską zawartość niepożądanych alkaloidów. Wykorzystanie klasycznych metod hodowlanych jest strategią dość prostą i tanią, lecz wymagającą systematycznej kontroli profilu alkaloidowego osobników rodzicielskich. Jack i in. (36) wskazują, że rośliny rodzicielskie, które wykazują ponad 3% konwersję nikotyny do nornikotyny, powinny być usuwane z produkcji nasiennej. Zastosowanie tak rygorystycznej procedury przesiewowej i krzyżowanie wyłącznie niekonwertujących genotypów prowadzi do znacznego obniżenia zawartości nornikotyny i *N*-nitrozonornikotyny (NNN) w porównaniu z populacjami tytoniu, które nie były poddane tym czynnościom. Gavilano i in. (28) donoszą o uzyskaniu tą drogą elitarnych linii hodowlanych/odmian o niskim współczynniku konwersji. Zaznaczają jednak, że znaczna część roślin (>20%) w warunkach polowych może zmienić fenotyp na konwerterowy. Lewis i in. (51) także zauważają, że klasyczna hodowla w połączeniu z eliminacją konwerterów z populacji nasiennych nie jest skutecznym rozwiązaniem, ponieważ w każdym następnym pokoleniu mogą spontanicznie powstawać rośliny o wysokiej zawartości nornikotyny. Tłumaczy to tym, że geny z rodziny *CYP 450* regulujące konwersję nikotyny znajdują się w niestabilnym locus sprzyjającym ich przemieszczaniu się, co w efekcie powoduje spontaniczne pojawianie osobników konwerterów. Stąd w populacjach odmian i linii hodowlanych, stabilnych pod względem wielu cech użytkowych, notuje się znaczne zróżnicowanie międzyosobnicze pod względem zawartości nikotyny i nornikotyny. Niekontrolowane pojawianie się konwerterów stanowi poważny problem, głównie wśród odmian typu Burley. Również w niektórych odmianach typu Virginia zawartość nornikotyny może przekraczać dopuszczalny poziom 3% sumy alkaloidów.

W celu pozyskania stabilnych, niskonikotynowych odmian tytoniu słuszne zatem wydaje się zastosowanie hodowli mutacyjnej. Technika ta polega na generowaniu trwałych, tj. podlegających dziedziczeniu zmian w materiale genetycznym przy użyciu czynników chemicznych lub fizycznych. Wymaga działania na dużych populacjach roślin w celu uzyskania grupy osobników o wysokim stopniu mutagenizacji i niezmienionej morfologii oraz dostępności czułych metod pozwalających na szybką identyfikację mutacji w sekwencjach docelowych. Uzyskana w wyniku jej stosowania zmienność genetyczna jest powszechnie akceptowana przez społeczeństwo. Julio i in. (40) przeprowadzili mutagenezę podkiełkowanych nasion silnie konwertującej odmiany tytoniu typu Burley BB16NN przy użyciu metylenosulfonianu etylu (EMS) w stężeniach 0,8% i 0,6%. Technika mutagenезy genu *N*-demetylazy nikotynowej (*NtabCYP82E4*) w połączeniu z krzyżowaniem wstecznym uzyskanych mutantów z wysokiej jakości odmianami tytoniu umożliwiła otrzymanie w krótkim czasie (1,5 roku) niekonwertujących linii hodowlanych typu Burley. Wygenerowany materiał

roślinny w odróżnieniu od uzyskanego w przypadku stosowania hodowli konwencjonalnej wyróżniał się stabilnym, niekonwerterowym fenotypem warunkowanym trwałą dezaktywacją alleli *NtabCYP82E4*. Również Lewis i in. (51) wskazują, że doskonalenie i modyfikacja profilu alkaloidowego odmian uprawnych tytoniu może opierać się na stosunkowo szybkiej i prostej hodowli mutacyjnej. Poddając nasiona silnie konwertującej linii Burley DH98-325-6 działaniu EMS, wywołali mutacje nokautujące w genach demetylazy nikotynowej (*CYP82E4* i *CYP82E5v2*). Następnie skrzyżowali mutanty punktowe w *CYP82E4* oraz *CYP82E5v2* w celu połączenia obydwu mutacji w jednym genomie i uzyskali rośliny homozygotyczne pod względem obydwu mutacji, które wykazywały średnią konwersję nikotyny na poziomie 2,3%. Dalsze krzyżowanie homozygotycznych genotypów *e4e4/e5e5* i dołączenie kolejnej mutacji w genie *CYP82E10* dało bardzo dobry efekt w postaci potrójnych mutantów (*e4e4/e5e5/e10e10*), u których konwersja nikotyny do nornikotyny wyniosła średnio 0,55%. Skutecznym rozwiązaniem w redukcji zawartości alkaloidów linii DH98-325-6 była także chemiczna mutageneza izoform rodziny genów *BBL* (*BBLa*, *BBLb* i *BBLc*), przy czym najlepsze rezultaty uzyskano dla homozygot z potrójną kombinacją mutacji – *bbla/bbla bblb/bblb bblc/bblc* (52).

Równie przydatnym narzędziem w realizacji strategii obniżania nikotyny w tytoniu jest inżynieria genetyczna wykorzystująca m.in. modyfikację genetyczną poprzez antysensowną regulację ekspresji genów uczestniczących w szlaku biosyntezy nikotyny. Xie i in. (82) wprowadzili do genomu tytoniu Burley 21 antysensowny konstrukt genu *NtQPT1* warunkującego produkcję enzymu QPT. Ekspresja antysensownego transkryptu w tej samej komórce, w której następowała ekspresja sensownego transkryptu endogennego genu zmniejszyła ilość produktu kodowanego przez gen endogeny. Otrzymano transgeniczną linię Vector 21-41, o niezmiennych cechach morfologicznych w stosunku do odmiany kontrolnej i bardzo niskiej zawartości nikotyny. Podobny efekt uzyskali Chintapakorn i Hamill (14) poprzez transformowanie antysensownym fragmentem genu warunkującego produkcję *N*-metylotransferazy putrescyny (PMT). Otrzymali linie transformowanych korzeni tytoniu, które wykazywały wyraźnie obniżoną aktywność PMT, z równoczesnym obniżeniem zawartości nikotyny w porównaniu z liniami kontrolnymi. Dodatkowo wykazali, że manipulacja poprzez wprowadzenie konstrukt antysens-PMT miała niewielki wpływ lub nie miała żadnego wpływu na poziom transkryptów innych genów kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm alkaloidów. Transgeniczna supresja genu *MPO* w korzeniach włósnikowatych tytoniu skutkowałą zmniejszeniem zawartości nikotyny. Towarzyszył jej jednak gwałtowny wzrost zawartości anatabiny (64). Wprowadzenie do komórek małych, interferujących, dwuniciowych fragmentów RNA (RNAi) zahamowało również ekspresję genów *A622* i *A622L* warunkujących kondensację pierścienia pirodiny i pirydiny, co znacząco obniżyło produkcję wszystkich alkaloidów i jednocześnie indukowało akumulację  $\beta$ -*N*-glukozydu kwasu nikotynowego w komórkach tytoniu (41). Również wyciszenie ekspresji genów *BBL*



za pomocą konstruktów opartych na RNAi zmniejszyło zawartość nikotyny w liściach większości roślin transgeniczných do poziomu około 10% zawartości obserwowanej w obiekcie kontrolnym. Co więcej, supresja *BBL* za pomocą RNAi w komórkach BY-2 indukowanych MeJA zredukowała zawartość wszystkich alkaloidów pirydynowych do nieistotnego poziomu (42). Stosując metodę interferencji RNA homologicznego do produktu genu demetylazy nikotynowej *CYP82E4*, odpowiedzialnego za większość przemian nikotyny do nornikotyny, obniżono poziom konwersji nikotyny do wartości 0,5% zarówno w linii silnie konwertującej, jak i słabo konwertującej (28, 50). Ważną strategią redukcji poziomu nikotyny była także modyfikacja genów odpowiedzialnych za transport nikotyny z korzeni do liści, w tym genu warunkującego produkcję permeazy wychwyty nikotyny (NUP 1). Zahamowanie produkcji NUP 1 doprowadziło do zmniejszenia akumulacji nikotyny zarówno w korzeniach, jak i w liściach tytoniu (35). Zablokowanie ekspresji genów na drodze interferencji RNA z wykorzystaniem silnych, konstytutywnych promotorów niesie za sobą wiele korzyści. Sprawia, że zmodyfikowane rośliny stanowią mniejsze zagrożenie dla zdrowia konsumentów tytoniu, a ponadto nie wymagają intensywnej ochrony chemicznej. Istnieje jednak szereg ujemnych stron wprowadzenia tego typu modyfikacji genetycznych, wśród których wymienia się letalność, zahamowanie wzrostu roślin, zwiększenie stężenia nowych metabolitów, jak np.: dihydrometanikotyny (DMN) lub pogorszenie jakości suszonych liści (41, 42). Wymienione wady, a także liczne ograniczenia prawne uniemożliwiają wprowadzenie do uprawy genetycznie modyfikowanych odmian tytoniu.

Szereg możliwości modyfikacji profilu alkaloidowego tytoniu stwarza stosunkowo nowe narzędzie biologii molekularnej CRISPR-Cas (ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*). Pozwala ono na precyzyjne wprowadzenie zmian genetycznych w DNA komórkowym, określaných jako edytowanie genomu, bez wprowadzenia obcych genów. Dzięki tej technologii można dokonać między innymi mutacji określonego genu, a uzyskane zmiany są nie do odróżnienia od mutacji naturalnych lub indukowanych. Edytowanie rodziny genów *BBL* skutkowało uzyskaniem beznikotynowych, nietransformowanych genetycznie roślin *N. tabacum* (62). Wciąż jednak trwają prace nad doskonaleniem techniki edytowania genomu i poznaniem potencjalnych zagrożeń wynikających z jej stosowania.

### Podsumowanie

Bardzo ważnymi składnikami tytoniu decydującymi o jakości technologicznej surowca są alkaloidy, wśród których ważną rolę odgrywają nikotyna i nornikotyna. Związki te wykazują silne działanie stymulujące na ludzi i zwierzęta poprzez oddziaływanie na ośrodkowy układ nerwowy, układ krwionośny i drogi oddechowe. W ostatnich latach liczne regulacje prawne skłaniające do obniżenia zawartości alkaloidów głównych w produktach tytoniowych, jak również rosnące wymagania podmiotów skupujących tytoń odnośnie jakości surowca i jego przydatności do pro-

dukcji tradycyjnych i elektronicznych papierosów, skłaniają do podejmowania prac badawczych i doskonalenia odmian uprawnych tego gatunku. Poprawę przydatności technologicznej odmian tytoniu przynosi hodowla selekcyjna oparta na eliminacji z populacji nasiennych osobników o niepożądanym profilu alkaloidowym. Dobrą alternatywą dla tradycyjnej hodowli jest hodowla mutacyjna oraz nowoczesne techniki biotechnologiczne, jak interferencja RNA czy technologia CRISPR-Cas. Ich wykorzystanie umożliwiło uzyskanie niemal beznikotynowych odmian tytoniu. Metody te nie znajdują jednak szerokiego praktycznego zastosowania z uwagi na niską akceptację społeczną organizmów genetycznie modyfikowanych.

## Literatura

1. Baldwin I.T., Zhang Z.P., Diab N., Ohnmeiss T.E., McCloud E.S., Lynds G.Y., Schmelz E.A.: Quantification, correlation and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*. *Planta*, 1997, **201**: 397-404.
2. Blakeley T., Bates M.: Nicotine and Tar in cigarette tobacco: a literature review to inform policy development, A report for the Ministry of Health of New Zealand, Institute of Environmental Science and Research Limited (ESR), 1998, p. 15-17.
3. Blaim K.: Występowanie normikotyny w *N. glutinosa*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 1963, **XXXII** 2: 303-312.
4. Biglouei M.H., Assimi M.H., Akbarzadeh A.: Effect of water stress at different growth stages on quantity and quality traits of Virginia (flue-cured) tobacco type. *Plant Soil and Environment*, 2010, **56**: 67-75.
5. Bowman D.T.: History of the Regional Minimum Standards Program for the release of flue-cured tobacco varieties in the United States. *Tobacco Science*, 1996, **40**: 99-110.
6. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. „alkaloid”. *Encyclopedia Britannica*, Invalid Date, <https://www.britannica.com/science/alkaloid>. Accessed 2 June 2022.
7. Burton H.R., Dye N.K., Bush L.P.: Distribution of tobacco constituents in tobacco leaf tissue. 1. Tobacco-specific nitrosamines, nitrate, nitrite and alkaloids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, **40**: 1050-1055.
8. Bush L., Hempfling W.P., Burton H.: Chapter 2 – Biosynthesis of nicotine and related compounds. In: Analytical determination of Nicotine and related compounds and their metabolites, J.W. Gorrod, P. Jacob (eds). Elsevier Science, 1999, pp. 13-44.
9. Cai B.: Enantioselective demethylation: the key to the normicotine enantiomeric composition in tobacco leaf. University of Kentucky. PhD Dissertation, 2012, p. 20-23.
10. Chakrabarti M., Meekins K.M., Gavalano L.B., Siminszky B.: Inactivation of the cytochrome P450 gene CYP82E2 by degenerative mutations was a key event in the evolution of the alkaloid profile of modern tobacco. *New Phytologist*, 2007, **175**(3): 565-574.
11. Chakrabarti M., Bowen S.W., Coleman N.P., Meekins K.M., Dewey R.E., Siminszky B.: CYP82E4-mediated nicotine to normicotine conversion in tobacco is regulated by a senescence-specific signaling pathway. *Plant Molecular Biology*, 2008, **66**: 415-427.
12. Chaze J.: The alkaloids of tobacco. *Annales des Sciences Naturelles Botaniques* 1932, **14**: 5-116.
13. Chelvarajan R.L., Fannin F.F., Bush L.P.: *In vitro* demethylation of nicotine. *Tob Chemists' Res. Conf.*, 1991, **45**: 18.
14. Chintapakorn Y., Hamill J.D.: Antisense-mediated down-regulation of putrescine N-methyltransferase activity in transgenic *Nicotiana tabacum* L. can lead to elevated levels of anatabine at the expense of nicotine. *Plant Molecular Biology*, 2003, **53**(1-2): 87-105.

15. Collins W.F., Hawks S.N.: Principles of flue-cured tobacco production. North Carolina State Univ. Raleigh., USA, 1993.
16. Congleton W.F., Collins W.K., Hawks S.N.: Effect of transplanting date on the yield, grade index, and sugar and total alkaloid concentration of flue-cured tobacco. Tobacco Science, 1980, **24**: 148-149.
17. Dalton D.R.: Biosynthesis of nicotinic acid. In: Studies in organic chemistry, P. Gassman (ed.). Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, 1980, pp. 147-149.
18. DeBoer K.D., Lye J.C., Aitken C.D., Su A.K.K., Hamill J.D.: The A622 gene in *Nicotiana glauca* (tree tobacco): evidence for a functional role in pyridine alkaloid synthesis. Plant Molecular Biology, 2009, **69**: 299-312.
19. Dewey R.E., Xie J.: Molecular genetics of alkaloid biosynthesis in *Nicotiana tabacum*. Phytochemistry, 2013, **94**: 10-27.
20. Djordjević M.V., Brunneemann K.D., Hoffmann D.: Identification and analysis of a nicotine-derived N-nitrosamino acid and other nitrosamino acids in tobacco. Carcinogenesis, 1989, **10(9)**: 1725-1731.
21. Djordjević M.V., Doran K.A.: Nicotine content and delivery Across Tobacco Products. In: Nicotine Psychopharmacology, J.E. Henningfield (ed.). Handbook of Experimental Pharmacology 192. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2009, pp. 61-82.
22. Donaldson R.P., Luster D.G.: Multiple forms of plant cytochrome P450. Plant Physiology, 1991, **96**: 669-674.
23. Drake M.P., Vann M.C., Fisher L.R.: Nitrogen application rate influence on yield, quality and chemical constituents of flue-cured tobacco, part I: Application timing. Tobacco Science, 2015, **52**: 11-17.
24. Farady A., Cuzn J., Schwartz D.: La nicotinogénese chez *Nicotiana tabacum* L. Resultats obtenus par la technique des micro-greffes at la culture de radicules d'embryons. Annales de l'institut expérimental du Tabac de Bergerac, 1953, **1**: 101-127.
25. Flores H.E., Filner P.: Metabolic relationship of putrescine, GABA and alkaloids in cell and rootcultures of *Solanaceae*. Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. In: K.H. Neumann, W. Barz, E. Reinhard (eds). Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1985, pp. 174-185.
26. Flower K.C.: Field practices. In: Tobacco: Production, chemistry, and technology, D.L. Davis and M.T. Nielsen (eds). Blackwell Science, London, UK, 1999, pp. 76-103.
27. Gaines J.G., Stephenson M.G., Gooden D.T.: Effects of nutrient deficiencies on chemical constituents on flue-cured tobacco. Tobacco Science, 1976, **20**: 95-97.
28. Gavilano L.B., Coleman N.P., Burnley L.E., Bowman M.L., Kalengamaliro N.E., Hayes A., Bush L., Siminszky B.: Genetic engineering of *Nicotiana tabacum* for reduced nornicotine content. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, **54(24)**: 9071-9078.
29. Gršić K., Butorac J., Čavlek M.: Effects of topping height, maturity and cultivar on the yield and chemical characteristics of flue-cured tobacco. Agriculturae Conspectus Scientificus, 2014, **79(3)**: 167-173.
30. Haberal M., Korpe D.A., Iseri O.D., Sahin F.I.: Grafting tomato onto tobacco rootstocks is a practical and feasible application for higher growth and leafing in different tobacco-tomato unions. Biological Agriculture Horticulture, 2016, **32**: 1-10.
31. Hawks S.N., Collins W.K., Kittrell B.U.: Effects of transplanting date, nitrogen rate and rate of harvest on extending the harvest of flue-cured tobacco. Tobacco Science, 1976, **20**: 51-54.
32. Hecht S.: Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. Nature Reviews Cancer, 2003, **3**: 733-744.
33. Henry J.B., Vann M.C., Lewis R.: Agronomic practices affecting nicotine concentration in flue-cured tobacco: a review. Agronomy Journal, 2019, **111**: 3067-3075.

34. Hibi N., Higashigushi S., Hashimoto T., Yamada Y.: Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. *Plant Cell*, 1994, **6**: 723-735.
35. Hildreth S.B., Gehman E.A., Yang H., Lu R.H., Ritesh K.C., Harich K.C., Yu S, Lin J., Sandoe J.L., Okumoto S., et al.: Tobacco nicotine uptake permease (NUP1) affects alkaloid metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **108**: 18179-18184.
36. Jack A., Fannin N., Bush L.P.: Implications of reducing nornicotine accumulation in burley tobacco. *Recent Advances in Tobacco Science*, 2007, **33**: 58-79.
37. Janowitz T., Kneifel H., Piotrowski M.: Identification and characterization of plant agmatine iminohydrolase, the last missing link in polyamine biosynthesis of plants. *FEBS Letters*, 2003, **544**: 258-261.
38. Jones J.L. Rideout J.W.: Application of flumetralin for axillary bud inhibition in flue-cured tobacco. *Tobacco Science*, 1986, **30**: 119-121.
39. Jeleško J.G.: An expanding role for purine uptake permease-like transporters in plant secondary metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 2012, **3**: 78.
40. Julio E., Laporte F., Reis S., Rothan C., Dorlac De Borne F.: Reducing the content of nornicotine in tobacco via targeted mutation breeding. *Molecular Breeding*, 2008, **21**: 369-381.
41. Kajikawa M., Hirai N., Hashimoto T.: A PIP-family protein is required for biosynthesis of tobacco alkaloids. *Plant Molecular Biology*, 2009, **69**: 287.
42. Kajikawa M., Shoji T., Kato A., Hashimoto T.: Vacuole-localized berberine bridge enzyme-like proteins are required for a late step of nicotine biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*, 2011, **155**: 2010-2022.
43. Kato K., Shoji T., Hashimoto T.: Tobacco nicotine uptake permease regulates the expression of a key transcription factor gene in the nicotine biosynthesis pathway. *Plant Physiology*, 2014, **166(4)**: 2195-204.
44. Kolińska A., Marciniak P., Adamski Z., Rosiński G.: Alkaloidy – naturalne substancje kardioaktywne. *Kosmos*, 2016, **65(2)**: 247-256.
45. Kołodziejczyk A.: *Naturalne związki organiczne*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2004, s. 389-457.
46. Kurek J.: Introductory Chapter: Alkaloids – Their importance in nature and for human life. In: *Alkaloids – Their importance in nature and human life*, J. Kurek (ed.). London, IntechOpen, 2019.
47. Lee E.: The incorporation of (5, 6-<sup>13</sup>C) nicotinic acid into the tobacco alkaloids examined by the use of <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance. *Bioorganic Chemistry*, 1977, **6**: 273.
48. Lee E.: Alkaloids derived from ornithine, lysine, and nicotinic acid. In: *Secondary plant products*. In: *Encyclopedia of plant physiology*, E.A. Bell, B.V. Charlwood (eds). New Series, Springer Verlag, 1980, pp. 65-91.
49. Lee E.: The methylation of nornicotine to nicotine, a minor biosynthetic pathway in *Nicotiana tabacum*. *Contributions to Tobacco & Nicotine Research*, 2014, **12(3)**: 113-116.
50. Lewis R.S., Jack A.M., Morris J.W., Robert V.J.M., Gavilano L., Siminszky B., Bush L.P., Hayes A., Dewey R.E.: RNAi-induced suppression of nicotine demethylase activity reduces levels of a key carcinogen in cured tobacco leaves. *Plant Biotechnology Journal*, 2008, **6**: 346-354.
51. Lewis R.S., Bowen S.W., Keogh M.R., Dewey R.E.: Three nicotine demethylase genes mediate nornicotine biosynthesis in *Nicotiana tabacum* L.: Functional characterization of the CYP82E10 gene. *Phytochemistry*, 2010, **71(17-18)**: 1988-1998.
52. Lewis R., Lopez H.O., Bowen S.W., Andres K.R., Steede W.T., Dewey R.E.: Transgenic and Mutation-Based suppression of a Berberine Bridge Enzyme-Like (BBL) gene family reduces alkaloid content in field-grown tobacco. *PLoS ONE*, 2015, **10(2)**: e0117273 .
53. Lolas P.C., Collins W.K., Hawks S.M., Seltmann H., Weeks W.W.: Effects of phosphorus rate on the chemical composition on flue-cured tobacco grown in soil with varying phosphorus availability. *Tobacco Science*, 1979, **23**: 31-34.

54. Malik S., Sara A.L., Andrade A., Sawaya C.H.F., Bottcher A., Mazzafera P.: Root-zone temperature alters alkaloid synthesis and accumulation in *Catharanthus roseus* and *Nicotiana tabacum*. *Industrial Crops and Products*, 2013, **49**: 318-325.
55. Markwood L.N.: Division of Insecticide Investigations. In: A review of information on nornicotine, L.N. Markwood (ed.). 1942, **561**: 1-24.
56. Matusiewicz E.: Przyrodnicze podstawy tytoniu. W: Tytoń uprawa, hodowla, fermentacja, J. Skiendzielewski (red.). PWRiL, Warszawa, 1969, ss. 19-52.
57. Miner G.S.: Effect of harvest method and related management practices on flue cured II: Total N, total alkaloids, reducing sugars and particulate matter index. *Tobacco Science*, 1980, **24**: 81-84.
58. Morita M., Shitan N., Sawada K., Van Montagu M.C., Inzé D., Rischer H., Goossens A., Oksman-Caldentey K.M., Moriyama Y., Yazaki K.: Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, **106**: 2447-2452.
59. Nielsen M.T., Cui M., Midgett C., Owen J.K.: Frequency of nicotine conversion and its relationship to TSNA formation in air-cured tobacco varieties. CORESTA Congress. New Orleans, 2002, AP 01.
60. Othman L., Sleiman A., Abdel-Massih R.M.: Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in Middle Eastern plants. *Frontiers in Microbiology*, 2019, **10**: 911.
61. Pallardy S.G.: Physiology of woody plants. Chapter 9 – Nitrogen metabolism, 2008, p. 233-254.
62. Schachtsiek J., Stehle F.: Nicotine-free, nontransgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) edited by CRISPR-Cas9. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, **17(12)**: 2228-2230.
63. Shoji T., Ogawa T., Hashimoto T.: Jasmonate-induced nicotine formation in tobacco is mediated by tobacco COI1 and JAZ genes. *Plant and Cell Physiology*, 2008, **49**: 1003-1012.
64. Shoji T., Hashimoto T.: Why does anatabine, but not nicotine, accumulate in jasmonate-elicited cultured tobacco BY-2 cells? *Plant and Cell Physiology*, 2008, **49(8)**: 1209-1216.
65. Shoji T., Inai K., Yazaki Y., Sato Y., Takase H., Shitan N., Yazaki K., Goto Y., Toyooka K., Matsuoka K. et al.: Multidrug and toxic compound extrusion-type transporters implicated in vacuolar sequestration of nicotine in tobacco roots. *Plant Physiology*, 2009, **149(2)**: 708-718.
66. Shoji T., Kajikawa M., Hashimoto T.: Clustered transcription factor genes regulate nicotine biosynthesis in tobacco. *Plant Cell*, 2010, **22(10)**: 3390-3409.
67. Siminszky B., Gavilano L., Steven W.B., Dewey R.E.: Conversion of nicotine to nornicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Biology*, 2005, **102(41)**: 14919-14924.
68. Stocks G.R., Whitty E.B.: Delayed topping effects on the yield, value, and leaf chemical components of photoperiod-sensitive flue-cured tobacco. *Tobacco Science*, 1994, **38**: 90-93.
69. Sun W., Zhou Z., Li Y., et al.: Differentiation of flue-cured tobacco leaves in different positions based on neutral volatiles with principal component analysis (PCA). *European Food Research and Technology*, 2012, **235**: 745-752.
70. Szymańska J., Frydrych B., Bruchajzer E.: Nikotyna. Dokumentacja dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy, 2007, **2(52)**: 121-154.
71. Tiburcio A.F., Ingersoll R., Galston A.W.: Modified alkaloid pattern in developing tobacco callus. *Plant Science*, 1985, **38**: 207-212.
72. Tso T.C., Kasperbauer M.J., Sorokin T.P.: Effect of photoperiod and end-of-day light quality on alkaloids and phenolic compounds of tobacco. *Plant Physiology*, 1970, **45(3)**: 330-333.
73. Tso T.C.: Seed to smoke. In: *Tobacco: Production, chemistry, and technology*, D.L. Davis, M.T. Nielsen (eds). Blackwell Sci., London, UK., 1999, pp. 1-31.

74. W a g n e r R., W a g n e r K.G.: The pyridine-nucleotide cycle in tobacco enzyme activities for the de-novo synthesis of NAD. *Planta*, 1985, **165**: 532-537.
75. W a g n e r R., F e t h F., W a g n e r K.G.: The pyridine nucleotide cycle in tobacco. Enzyme activities for the recycling of NAD. *Planta*, 1986a, **167**: 226-232.
76. W a g n e r R., F e t h F., W a g n e r K.G.: Regulation in tobacco callus of enzyme activities of the nicotine pathway: II. The pyridine-nucleotide cycle. *Planta*, 1986b, **168**: 408-413.
77. W a n g B., L e w i s R.S., S h i J., S o n g Z., G a o Y., L i W., C h e n H., Q u R.: Genetic factors for enhancement of nicotine levels in cultivated tobacco. *Scientific Reports*, 2015, **5**: 17360.
78. W e e k s W.W., B u s h L.P.: Alkaloid changes in tobacco seeds during germination. *Plant Physiology*, 1974, **53**: 73-5.
79. W e y b r e w J.A., J o n e s G.L., M a n n T.J., W o l t z W.G., H u t c h e s o n T.B., N u s b a u m C.J., v a n B a v e l C.H.M.: Factors affecting the nicotine content of Flue-cured tobacco. *Research Report*, 1953, **8**: 1-20.
80. W i l k i n s o n W.C., F i s h e r L.R., S m i t h W.D., J o r d a n D.L.: Effects of stand loss, planting, date, and replanting method on yield and quality of flue-cured tobacco. *Tobacco Science*, 2008, **47**: 44-52.
81. V a n n M.C., F i s h e r L.R., J o r d a n D.L., H a r d y D.H., S m i t h W.D., S t e w a r t A.M.: The effect of potassium on the yield and quality of flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Tobacco Science*, 2012, **49**: 14-20.
82. X i e J., S o n g W., M a k s y m o w i c z W., J i n W., C h e a h K., C h e n W., C a r n e s C., K e J., C o n k l i n g M.A.: Biotechnology: A tool for reduced risk tobacco products – The nicotine experience from test tube to cigarette pack. 58th Meeting Tobacco Science Research Conference, 2004, NC:17
83. Z e n k n e r F.F., M a r g i s - P i n h e i r o M., C a g l i a r i A.: Nicotine biosynthesis in *Nicotiana*: a metabolic overview. *Tobacco Science*, 2019, **56(1)**: 1-9.

---

Adres do korespondencji:

*dr hab. Anna Trojak-Goluch; mgr Magdalena Kawka-Lipińska*  
*Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin*  
*IUNG-PIB*

*ul. Czartoryskich 8*  
*24-100 Puławy*

*tel.: 81 4786 933; 81 4786 934*

*e-mail: Anna.Trojak-Goluch@iung.pulawy.pl;*

*Magdalena.Kawka@iung.pulawy.pl*

---

AUTOR	ORCID
Anna Trojak-Goluch	0000-0002-5191-4414
Magdalena Kawka-Lipińska	0000-0003-1039-5280



**Anna Czubačka**

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

## GENETYCZNE PODSTAWY PRODUKCJI WYBRANYCH METABOLITÓW WTÓRNYCH W CHMIELU\*

**Słowa kluczowe:** ekspresja genów, kwasy goryczkowe, fenylopropanoidy, związki fenolowe, stresy biotyczne i abiotyczne

### Wstęp

Chmiel (*Humulus lupulus* L.) jest gatunkiem uprawianym głównie na potrzeby przemysłu piwowarskiego. Znajduje także zastosowanie w przemyśle kosmetycznym, ponieważ produkty drogeryjne zawierające ekstrakty z chmielu działają przeciwbakteryjnie i grzybobójczo, poprawiają elastyczność skóry i wzmacniają włosy. Chmiel jest wykorzystywany w przemyśle farmaceutycznym ze względu na właściwości uspakajające i nasenne, łagodzenie menopauzy i łagodne obniżanie ciśnienia krwi. Rośliny chmielu są bowiem bogatym źródłem metabolitów wykazujących działanie prozdrowotne, z których najwięcej jest produkowanych w owocostanach żeńskich zwanych szyszkami. Cenne związki powstają w gruczołach lupulinowych obecnych na listkach okwiatu i okrywy kwiatowej (1, 34).

### Biosynteza metabolitów wtórnych chmielu

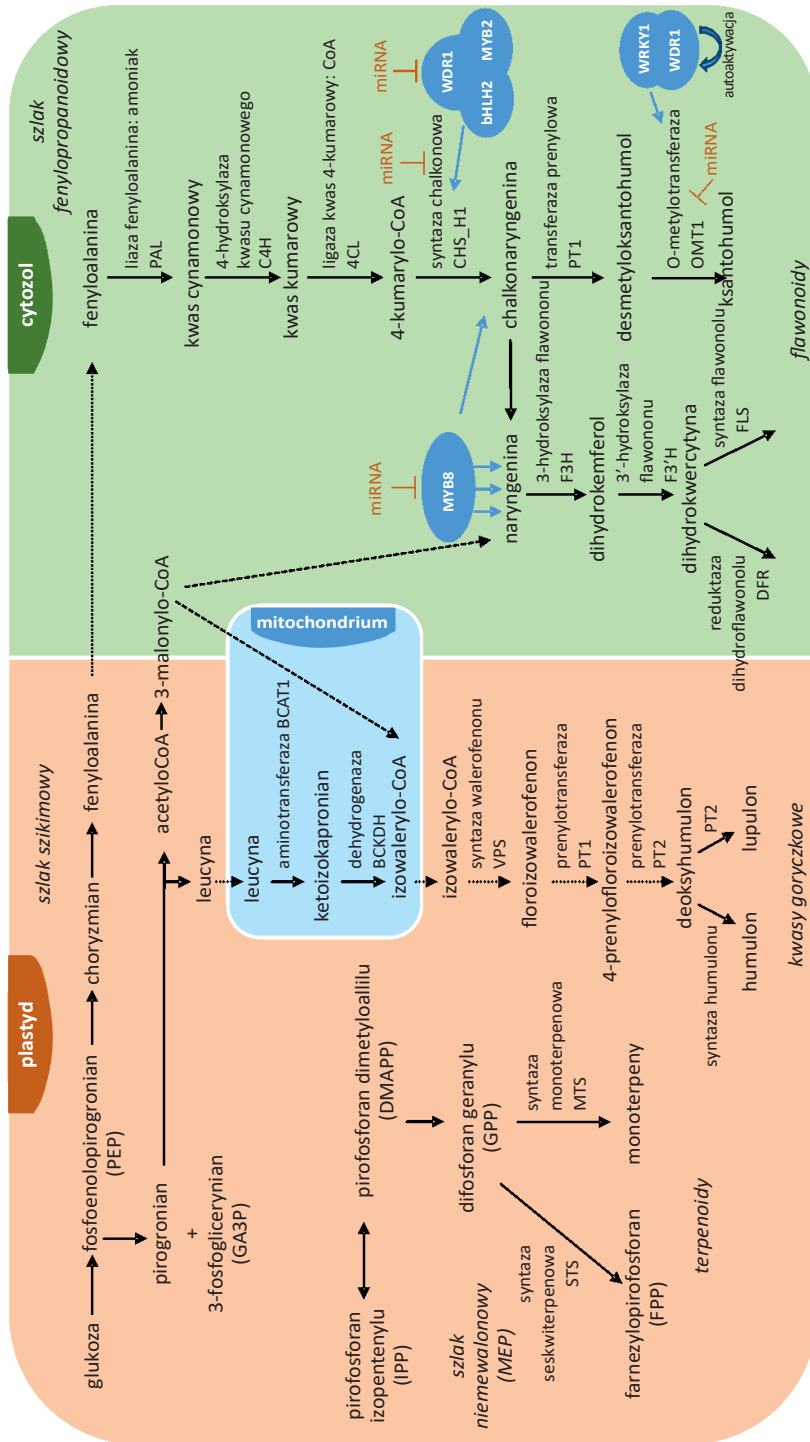
Metabolity wtórne to związki, które nie są bezpośrednio konieczne do wzrostu, rozwoju czy reprodukcji roślin, ale są zaangażowane w ich oddziaływanie ze środowiskiem (3). Główne metabolity wtórne chmielu należą do olejków eterycznych i kwasów goryczkowych, a także prenylowanych flawonoidów (12). Wspólnym prekursorem tych grup związków jest pirofosforan dimetyloallilu (DMAPP) (rys. 1).

\*Opracowanie wykonano w ramach zadania 6.3 pt. „Upowszechnianie wiedzy o wynikach uzyskiwanych w ramach realizacji zadania (hodowla i nasiennictwo chmielu i tytoniu)” z dotacji budżetowej przeznaczonej na realizację zadań MRiRW w 2022 r.



Kwasy goryczkowe są preadenylowanymi poliketydami, do których należą  $\alpha$ -kwasy oraz  $\beta$ -kwasy. W skład tych pierwszych wchodzi humulon, kohumulon i adhumulon, natomiast  $\beta$ -kwasy to lupulon, kolupulon i adlupulon (1, 9, 13). Pochodzą one z prekursorów pirogronianu tworzonych w szlaku prowadzącym do powstania aminokwasów rozgałęzionych (BCAA, ang. *branched-chain amino acids*). Ostatni etap tego szlaku jest katalizowany przez enzym BCAT2 (ang. *branched-chain amino transferase 2*). Następnie aminokwasy rozgałęzione (leucyna, izoleucyna, walina) są wykorzystane w szlaku prowadzącym do syntezy kwasów goryczkowych. Początkowo aminokwasy podlegają degradacji w mitochondrium przez enzymy BCAT1 (ang. *branched-chain amino transferase 1*) i BCKDH (ang. *branched-chain keto-acid dehydrogenase*), a następnie w cytozolu przekształcone do floroizowalerofenonu (PIVP) przez syntazę walerofenonu (VPS). Floroizowalerofenon może także powstawać równolegle w chloroplastach w wyniku szlaku fosforanu metyloerytrytolu (MEP) (9, 12). PIVP podlega prenylacji przez prenylotransferazy PT1/PT1L i PT2 do związków będących bezpośrednimi prekursorami kwasów goryczkowych, które powstają w chloroplastach. Ostatnim etapem syntezy  $\alpha$ -kwasów jest prawdopodobnie przemiana katalizowana przez hydrosylazę deoksyhumuloniu lub syntazę humuloniu (HS1 lub HS2) (9, 13, 29). Natomiast w końcowym etapie produkcji  $\beta$ -kwasów uczestniczy enzym PT-2 (9, 23, 27).

Głównym prenyloflawonoidem występującym w chmielu jest ksantohumol, czyli 2',4',4'-trihydroksy-6-metoksy-3-(3-metylo-but-2-en-1-yl)chalkon (12). Stanowi on ponad 1% masy suszonych szyszek (34). Ksantohumol powstaje z fenyloalaniny (rys. 1). Aminokwas ten zostaje przekształcony do p-kumarylo-CoA, który w reakcji katalizowanej przez syntazę chalkonową i izomerazę chalkonową CHIL2 ulega przemianie do chalkonaryngeniny. Ta z kolei przy aktywności prenylotransferazy PT1L zostaje przekształcona do demetyloksantohumolu, który ulega metylacji do ksantohumolu przy udziale O-metylotransferazy OMT1 (3, 9, 12, 23, 27). Inne chmielowe prenyloflawonoidy to: desmetyloksantohumol, izokksantohumol (izomer ksantohumolu), dehydrocykloksantohumol, 8-prenylonaryngenina i 6-prenylonaryngenina (27, 34). Chalkonaryngenina może zostać przekształcona także do naryngeniny, która staje się prekursorem związków fenolowych, do których należą flawonole, flawan-3-ole, tanniny, lignany, kwasy fenolowe i stilbenoidy (27). Związki te występują w największej koncentracji w nasionach i listkach okwiatu (3).



Rys. 1. Schemat syntezy metabolitów wtórnych chmielu, takich jak: terpenoidy, kwasy goryczkowe, fenylpropanoidy, flawonoidy (23)

Chmiel jest także bogaty w olejki eteryczne, które powstają w gruczołach lupulinowych. Za charakterystyczny aromat roślin odpowiada kompozycja ponad 300 związków lotnych. Ich zawartość w chmielu wynosi od 0,03% do 3% (1). Każda odmiana charakteryzuje się nieco innym składem olejków. Także proporcje ich zawartości są zróżnicowane. Przeważnie 2 lub 3 związki są obecne w wysokim stężeniu i stanowią 20–70% całkowitej zawartości olejków. Zwykle w największych ilościach występują takie związki, jak:  $\beta$ -myrcen,  $\alpha$ -humulen,  $\beta$ -kariofilen, tlenek kariofilenu i epoksyd II humulenu. Najważniejszym składnikiem olejku chmielowego jest monoterpenny myrcen (27, 34). Prekursory tych związków powstają w szlaku metabolicznym MEP, po czym podlegają przemianie do difosforanu geranylu (GPP), a następnie w reakcji katalizowanej przez syntazę monoterpenną (MTS1, MTS2) do  $\beta$ -myrcenu lub przez inną syntazę do farnezylopirofosforanu (FPP) (rys. 1). Następnie syntaza seskwiterpennowa I (STS1) prowadzi do powstania kariofilenu i humulenu (9).

### **Kluczowe geny warunkujące produkcję metabolitów wtórnych chmielu**

Chmiel jest rośliną diploidalną o liczbie chromosomów  $2n = 20$ , przy czym 9 par to chromosomy autosomalne, a dwa (X i Y) determinują płeć (21). Wielkość genomu została określona jako 5,62 pg i około 2050 Mb, przy czym liczbę genów kodujących białka oszacowano na ponad 41 tysięcy (24). Poszczególne etapy szlaków metabolicznych są kontrolowane przez szereg genów kodujących enzymy i czynniki transkrypcyjne, czy też odpowiadających za ich aktywność. Aktywność genów może zależeć od odmiany (genotypu), organu i fazy rozwojowej rośliny.

W wyniku ewolucji, a także jako efekt selekcji prowadzonej w ramach hodowli, doszło do wykształcenia kilkunastu homologów tworzących rodzinę genu *CHS* (20). Jeden z nich – gen kodujący kluczowy enzym szlaku produkcji kwasów goryczkowych *VPS* w chmielu został po raz pierwszy opisany przez Okadę i Ito (26). Natomiast gen wykazujący względem niego homologię, kodujący enzym o aktywności syntazy chalkonowej został scharakteryzowany przez Matouška i in. (19, 20) i opisany jako *CHS\_H1*. Obecność dużej ilości mRNA powstałego na bazie genu *CHS\_H1* wykryto w dojrzewających szyszkach, niższą zawartość stwierdzono w kwiatach i wierzchołkach wzrostu, a najniższą w korzeniach i liściach. Homologi genu *CHS\_H1* – geny *CHS2*, *CHS3* i *CHS4* – zostały zmapowane jako tworzące wspólną grupę powiązań (5), po czym grupa ta została poszerzona o dwa kolejne geny – *VPS* i *CHS\_H1* (6). Enzym *VPS* posiada bowiem także aktywność syntazy chalkonowej, ale jest ona znacznie słabsza niż aktywność syntazy walerofenonu, co sprawia, że enzym ten pełni istotną rolę w produkcji kwasów goryczkowych, a tylko nieznaczną w szlaku prenylopropanoidowym (13).

Aktywność genu *VPS* jest wyższa w szyszkach niż w innych organach i rośnie wraz ze stopniem dojrzałości szyszek (4, 8). W szyszkach obserwowana jest także wyższa aktywność genów *BCAT2*, *CHS\_H1*, *HS1* i *HS2* (8, 23). Natomiast takie geny

jak *PTIL*, *PT2* i *BCAT* podlegają ekspresji niemal wyłącznie w szyszkach, przy czym ich ekspresję odnotowano nie tylko w gruczołach lupulinowych, ale także w tkance przylistków (23). Geny *PTIL*, *VPS*, *PT2* i *BCAT1* są od 100 do 170 razy bardziej aktywne w gruczołach lupulinowych niż w liściach (29). Jednocześnie nie obserwowano różnic w aktywności genów *VPS* i *PT2* pomiędzy odmianami goryczkowymi i aromatycznymi. Tymczasem geny kodujące syntazę humulonową *HS1* i *HS2* podlegały 5,8 razy silniej ekspresji w odmianach goryczkowych. Podobnie wyższą aktywność genów kodujących syntazę chalkonową zaobserwowano u odmian chmielu, które cechują się większą zawartością kwasów goryczkowych (25).

W szyszkach obserwuje się wyższą niż w liściach aktywność genów *MTS1* i *MTS2*, *OMT1*, *PT1* (24). Natomiast gen *GPPS* podlega wysokiej ekspresji zarówno w szyszkach, jak i liściach, co może wynikać z faktu, że izoprenoidy GPP i FPP są nie tylko produktami pośrednimi w szlaku powstawania kwasów goryczkowych, ale też prekursorami w innych szlakach metabolicznych zachodzących w komórkach. Cytozolowa ligaza koenzymu A (*CCL2*), która katalizuje tworzenie izowalerylo-CoA, w większej ilości jest produkowana w gruczołach lupulinowych szyszek niż w liściach. Z kolei geny kodujące inne ligazy CCL, tj. *CCL3*, *CCL4*, *CCL10*, *CCL12*, zaangażowane w metabolizm podstawowy roślin, podlegają podobnej ekspresji w liściach i szyszkach, niezależnie od fazy rozwojowej kwiatostanów żeńskich (36). Ponadto zaobserwowano, że geny zaangażowane w produkcję terpenoidów i prenylopropanoidów podlegają większej ekspresji w japońskiej odmianie uprawnej Shinshu Wase niż w dzikiej odmianie *Humulus lupulus* var. *cordifolius* (24), co jest zrozumiałe, biorąc pod uwagę, że jednym z głównych kierunków hodowli nowych odmian jest właśnie zwiększenie zawartości metabolitów wtórnych istotnych dla przemysłu.

### Geny regulatorowe syntezy metabolitów wtórnych

Poza genami kodującymi białka bezpośrednio zaangażowane w produkcję metabolitów wtórnych, istnieje cały szereg innych genów kodujących związki pełniące funkcje regulatorowe. Należą do nich czynniki transkrypcyjne TF (ang. *transcription factor*) z rodzin, np.: *bHLH*, *MYB*, *WDR* czy *WRKY* (18, 23). Transkrypt czynnika MYB3 jako pojedynczy czynnik lub też w kompleksie utworzonym z czynnikiem WDR1 wpływa aktywnie na gen *CHS4* (11, 17). Z kolei promotor genu *CHS\_H1* jest regulowany przez kompleksy transkrypcyjne, takie jak trójbiałkowy MBW (MYB3/bHLH2/WDR1 lub MYB2/bHLH2/WDR1) lub dwubiałkowy (bHLH2/WDR1) (18, 23). Natomiast czynnik transkrypcyjny MYB7 został opisany jako inhibitor kompleksu MYB/bHLH/WDR1. Gatica-Arias i in. (11) wykazali, że nadekspresja tego czynnika w transgenicznym roślaku spowodowała zmniejszenie ekspresji genów kodujących syntazę chalkonową (*CHS\_H1*), izomerazę chalkonową (*CHI*), 3-hydroksylazę i 3'-hydroksylazę flawanonu (*F3H* i *F3'H*), syntazę flawanolu (*FLS*) oraz O-metylotransferazę (*OMT1*).

Zwiększenie zawartości prenyloflawonoidów i kwasów goryczkowych w transgenicznym chmielu z nadekspresją genów *WRKY1* i *WDR1* wskazuje na udział białek *WRKY1/WDR1* w stymulowaniu kompleksu MBW oraz enzymu *OMT1* (22). Oznaczenie poziomu ekspresji genów za pomocą metody real-time PCR wykazało znacznie wyższą aktywność *WRKY1* niż *WDR1*. Wynika to ze zdolności czynnika transkrypcyjnego *WRKY1* do aktywowania ekspresji kodującego go genu (17). Gen ten jest sterowany promotorem, który posiada miejsce wiązania białka będącego jego produktem i w ten sposób dochodzi do autoaktywacji genu *WRKY1*. Czynniki *WRKY1* i *WDR1*, łącznie lub niezależnie od siebie, wpływają aktywująco na geny *OMT1* i *PRT1*. Mogą też we współpracy z kompleksem MBW w sposób pośredni aktywować gen *CHS\_HI* (22). Ponadto *WRKY1* stymuluje ekspresję genu *MYB3* w gruczołach lupulinowych (17). W zależności od stanu fizjologicznego rośliny akumulacja transkrypty *WRKY1* ulega gwałtownym wahaniom, co jest możliwe dzięki potranskrypcyjnemu wyciszeniu, a jednocześnie zdolności do autoaktywacji genu.

Badania przeprowadzone na transgenicznym chmielu wykazującym nadekspresję genu *MYB8* wykazały, że powstający na jego bazie czynnik transkrypcyjny aktywuje ekspresję genu *CHS\_HI* oraz genów istotnych w biosyntezie flawonoidów, tj. *F3H*, *F'3H*, *FLS* (15). Jednocześnie *MYB8* wpływa hamująco na ekspresję genów *OMT1* i *PTI* zaangażowanych w końcowe etapy biosyntezy prenyloflawonoidów i kwasów goryczkowych. W ten sposób czynnik transkrypcyjny ma zdolność przekierowania produktu genu *CHS\_HI* w stronę syntezy flawonoli przy jednoczesnej redukcji syntezy desmetyloksantohumolu i ksantohumolu oraz kwasów goryczkowych. Ekspresja *MYB8* jest szczególnie duża w gruczołach lupulinowych. Jednak ma miejsce również w młodych liściach, co jest związane z obecnością gruczołów lupulinowych w ich wierzchołkowej części.

Transkrypty innych genów istotnych w regulacji produkcji prenyloflawonoidów, takie jak: *bHLH2*, *WDR1*, *WRKY1*, *MYB1*, *MYB2*, *MYB3*, *MYB7*, stwierdzono nie tylko w gruczołach lupulinowych, ale też w przylistkach i w liściach, przy czym w tych ostatnich występowały w znacznie mniejszych ilościach (11, 23). Według Patzaka i in. (29) geny czynników transkrypcyjnych *MYB7*, *MYB8*, *MYB78* i *WRKY1* w poszczególnych tkankach podlegają ekspresji na zbliżonym poziomie niezależnie od tego, czy materiał badawczy stanowią odmiany aromatyczne czy goryczkowe. Natomiast gen *MYB3* jest istotnie bardziej aktywny w liściach odmian aromatycznych niż goryczkowych, a gen *bHLH2* w gruczołach lupulinowych tychże odmian.

### Wpływ czynników stresowych na aktywność genów

Aktywność genów może ulegać zmianom w zależności od czynników zewnętrznych abiotycznych i biotycznych. Zmiany w produkcji metabolitów wtórnych stanowią często odpowiedź na zmieniające się warunki zewnętrzne. Związki te bowiem pełnią rolę ochronną, łagodząc niekorzystny wpływ stresów na rośliny.

Eriksen i in. (9) badali ekspresję genów zaangażowanych w szlaki metaboliczne prowadzące do syntezy metabolitów wtórnych w liściach chmielu w warunkach stresu termicznego i niedoboru wody. Zidentyfikowali 43 transkrypty genów kodujących białka biorące udział w syntezie kwasów goryczkowych. Wśród nich jest syntaza humulonu oraz enzymy najprawdopodobniej zaangażowane w szlakach metabolicznych degradacji BCAA, VPS i MEP. Wśród transkryptów, których poziom uległ obniżeniu na skutek stresu znalazły się dwa prawdopodobne transkrypty – *VPS* oraz syntazy chalkonowej.

Zmiany w ekspresji zaobserwowano również w przypadku genów zaangażowanych w biosyntezę, a także degradację aminokwasów rozgałęzionych oraz w szlakach prowadzących do powstania syntazy walerofenonu i syntazy humulonu oraz uczestniczących w szlaku niemewalonowym. Geny te w warunkach stresu podlegały niższej ekspresji (tab. 1) (9, 28).

Pod wpływem wysokiej temperatury (39°C przez 6 tygodni) w liściach chmielu doszło do obniżenia ekspresji czterech transkryptów syntazy chalkonowej oraz dwóch transkryptów syntazy walerofenonu w porównaniu z roślinami utrzymywanymi w warunkach kontrolnych, tj. w temperaturze 24°C (tab. 2) (9). Również niedobór wody spowodował obniżenie poziomu ekspresji genów odpowiedzialnych za produkcję tych dwóch enzymów, a także syntazy humulonu, przy czym odnotowano podwyższoną produkcję transkryptów syntazy seskwiterpenowej (tab. 3). Jednak największe zmiany w aktywności genów zaobserwowano w roślinach, które były poddane działaniu obu czynników stresowych jednocześnie. W warunkach wysokiej temperatury i suszy doszło do ograniczenia ekspresji genów syntaz: walerofenonu, chalkonowej, seskwiterpenowej i monoterpenowej, a także prenylotransferazy i aminotransferazy BCAT2.

Należy pamiętać, że materiałem badawczym w analizach Eriksena i in. (9) były liście chmielu, na których co prawda obecne są trychomy z gruczołami lupulinowymi, ale ich zagęszczenie jest niewielkie. Tymczasem główna produkcja kwasów goryczkowych i ksantohumolu odbywa się w gruczołach lupulinowych w szyszkach (27).

Poza czynnikami abiotycznymi na aktywność genów wpływ mogą mieć także czynniki biotyczne, w tym infekcje patogenami. Zakażenie wiroidem karłowatości chmielu HSVd (ang. *Hop stunt viroid*) wpłynęło redukująco na ekspresję genu kodującego syntazę chalkonową w liściach i ogonkach liściowych (tab. 2). Aktywność tego genu zmalała nawet 40-krotnie (10) w stosunku do roślin zdrowych. Ponadto w zainfekowanych roślinach zaobserwowano zmiany w aktywności genów kodujących białka wchodzące w skład potrójnego kompleksu regulującego transkrypcję genu *CHS\_H1*. Stwierdzono spadek aktywności genów odpowiedzialnych za produkcję białek bHLH1 i bHLH2, a jednocześnie zanotowano trzykrotny wzrost aktywności genu kodującego białko MYB3. Takie zaburzenie proporcji między czynnikami transkrypcyjnymi prowadzi do zakłóceń w aktywności promotora. Ponadto prawdopodobnie wiroid także w sposób bezpośredni wpływa na degradację mRNA powstałego na bazie genu *CHS\_H1*, nie pozwalając na utworzenie enzymu. W efekcie niska aktywność genu

*CHS\_HI* przekłada się na zmniejszenie produkcji metabolitów wtórnych, takich jak glikozydy flawonolowe czy kwasy fenolowe w porażonych roślinach.

Natomiast w przypadku infekcji wiroidem utajonym chmielu HLVd (ang. *Hop latent viroid*) w szyszkach zaobserwowano wzrost aktywności genu *CHS\_HI* w odmianie Saaz, podczas gdy w pozostałych badanych odmianach – Sládek, Premiant i Agnus – zmiany w ekspresji były niewielkie i nieistotne statystycznie (28). Wczesniejsze analizy biochemiczne prowadzone przez Jelinka i in. (14) wykazały w zainfekowanych roślinach odmiany Saaz podwyższoną zawartość takich związków polifenolowych, jak katechiny i epikatechiny. Proste związki fenolowe, kwasy fenolowe, flawanole i dihydrochalkony pełnią rolę ochronną w roślinach i wykazują właściwości antywirusowe.

Pistelli i in. (32) analizowali zawartość metabolitów wtórnych istotnych dla przemysłu piwowarskiego w szyszkach pięciu polskich odmian chmielu, porównując rośliny zdrowe i zainfekowane ApMV (ang. *Apple Mosaic Virus*), HpMV (ang. *Hop Mosaic Virus*) oraz HLVd. Uzyskane wyniki nie pozwoliły na stwierdzenie, że infekcja niekorzystnie wpływa na koncentrację metabolitów. Zaobserwowano wystąpienie niewielkich zmian w zawartości mono- i sekwiterpenów, przy czym zmiany w akumulacji tych związków były różne w różnych odmianach. Rośliny zdrowe należące do odmian Magnat, Marynka, Puławski i Sybilla miały więcej  $\alpha$ -kwasów niż ich chore odpowiedniki, ale już w odmianie Lubelski nie odnotowano różnic. Z kolei  $\beta$ -kwasy wystąpiły w większej ilości w zdrowych roślinach odmian: Sybilla, Lubelski, Puławski, a w odmianach Magnat i Marynka to właśnie szyszki zainfekowanych roślin były bogatsze w te związki. Natomiast Jelinek i in. (14) badali jedną odmianę – Saaz i w zainfekowanych roślinach obserwowali obniżenie poziomu  $\alpha$ - i  $\beta$ -kwasów. Badania Pethybridge i in. (31) wskazują, że infekcja wirusowa nie zawsze wiąże się z obniżeniem zawartości kwasów goryczkowych. Badali oni cztery odmiany chmielu zainfekowane wirusami HpMV, HpLV (ang. *Hop latent virus*), PNRSV (ang. *Prunus necrotic ringspot virus*) oraz podlegające infekcjom mieszanym. Przeważnie rośliny porażone więcej niż jednym wirusem produkowały mniej kwasów goryczkowych.

Pod wpływem infekcji wiroidem utajonym chmielu (HLVd) aktywność genu kodującego czynnik transkrypcyjny MYB78 w odmianie Premiant spadła 6,5 raza (tab. 4) (28). Z kolei w odmianach Sládek i Premiant odnotowano spadek aktywności genów kodujących czynniki transkrypcyjne MYB3 (odpowiednio: 4,4 razy i 5,9 razy) oraz WRKY1 (odpowiednio: 1,9 razy i 2,7 razy) przy jednoczesnym braku zmian w aktywności genu *bHLH2* we wszystkich czterech badanych odmianach. Natomiast obserwowano zmiany w ekspresji innego czynnika transkrypcyjnego z grupy bHLH, a mianowicie bHLH4, którego aktywność wzrosła w odmianie Sládek (2,6 razy), a zmalała w odmianie Saaz (1,6 razy).

Z kolei infekcja chmielu patogenem grzybowym *Verticillium nonalfalfae* przyczyniła się do zmian w transkrypcji genu 4-hydroksylazy kwasu cynamonowego, która jest jednym z enzymów szlaku fenylopropanoidowego (tab. 2) (35). Zmiany nie były jednakowe w całej roślinie, ale zależały od organu. W korzeniach badacze odnoto-

wali spadek, a w łodygach wzrost aktywności genu. Co więcej, w odmianie podatnej Celeia zmiany były wyraźniejsze w korzeniach (2,5-krotny spadek aktywności genu w stosunku do roślin niezakażonych), a w odmianie odpornej Wye Target – w łodydze (2,5-krotny wzrost aktywności genu).

Analiza transkrypcyjna RNAseq przeprowadzona przez Progara i in. (33) wykazała, że zakażenie *V. nonalfalfae* wpływa na zmianę aktywności wielu genów chmielu. Spośród nich geny zaangażowane w produkcję metabolitów wtórnych stanowiły 6 i 7%, odpowiednio w korzeniach i pędach w przypadku odmiany odpornej, a 12% niezależnie od organu w przypadku odmiany podatnej. Ponadto w odmianie podatnej 3–4% genów, których ekspresja w pędach jest zmieniona, koduje białka uczestniczące w szlaku fenylopropanoidowym, podczas gdy w roślinach odpornych – 1%. Natomiast w korzeniach nie wykryto różnic w aktywności żadnego z genów tego szlaku. Większość zmian dotyczyła zmniejszenia poziomu ekspresji i miała miejsce częściej w pędach niż w korzeniach. Tylko około 2% genów o zmienionej ekspresji to te zaangażowane w szlak biosyntezy flawonoidów w pędach i korzeniach roślin podatnych i pędach roślin odpornych. Natomiast w korzeniach nie odnotowano modyfikacji w aktywności genów istotnych w syntezie flawonoidów.

Szeroką grupą metabolitów wtórnych chmielu są polifenole, które powstają w szlaku szikimowym (fenylopropanoidy), szlaku malonianowym (poliketydy) oraz w wyniku połączenia tych szlaków (flawonoidy) (rys. 1) (7). Berne i in. (2) badali, jakie zmiany pod wpływem infekcji *V. nonalfalfae* zachodzą w zawartości związków polifenolowych w roślinach należących do odmian Celeia i Wye Target. Zaobserwowali, że dochodzi do spadku zawartości polifenoli w korzeniach odmiany podatnej (1,1–3,7 razy) i w pędach odmiany odpornej (3,9–13 razy). Stwierdzili ponadto, że produkcja tej grupy związków jest zróżnicowana w poszczególnych częściach rośliny w zależności od jej fazy rozwojowej. Przed kwitnieniem polifenole są skoncentrowane głównie w korzeniach, gdzie jest ich 10-krotnie więcej niż w pędach. Natomiast ich ilość rośnie w części nadziemnej wraz z rozwojem, co powoduje, że pędy kwitnących roślin mają zawartość związków polifenolowych zbliżoną do korzeni lub nawet wyższą.

Polifenole przyczyniają się do niespecyficznego odporności roślin na stesy. Na przykład w wyniku uszkodzenia mechanicznego dochodzi do uwolnienia związków fenolowych, a następnie do ich utlenienia, które skutkuje polimeryzacją i wykrzystalizowaniem powstałych związków w lignifikacji ścian komórkowych, co wzmacnia strukturę roślinne (2). Utlenione fenole powodują także indukcję kwasu indol-3-octowego (IAA), który stymuluje wytwarzanie tyloz będących wytworami komórek roślinnych sąsiadujących z ksylemem zasiedlonym przez patogeny. Odmiana Wye Target – odporna na werciliozę – charakteryzuje się stosunkowo wysoką zawartością związków fenolowych w porównaniu z innymi odmianami chmielu (2). W przypadku odmian podatnych dopiero infekcja patogenem grzybowym prowadzi do zwiększonej aktywności genów uczestniczących w szlaku fenylopropanoidowym (33). Jednak mimo wysokiej aktywności genów obserwuje się zmniejszoną zawartość związków



fenolowych w roślinach zainfekowanych grzybem. Może to być wynikiem działania mechanizmów obronnych patogenu polegających na zakłócaniu metabolizmu komórek gospodarza (2). Ponadto pod wpływem infekcji związki polifenolowe podlegają estryfikacji i są wykorzystywane do wzmożonej produkcji ligniny w celu wzmocnienia ścian komórkowych. W efekcie ich ekstrakcja staje się trudniejsza, przez co nie są w pełni izolowane z badanego materiału.

Tabela 1

Zmiany w aktywności genów kodujących enzymy zaangażowane w produkcję kwasów goryczkowych chmielu

Gen	Kodowany enzym	Czynnik stresowy	Aktywność genu	Tkanka	Referencje
BCAT1	aminotransferaza	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28
BCAT2	aminotransferaza	susza+wysoka temperatura	spadek	liście	9
VPS	syntaza walerofenonu	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28
		susza/wysoka temperatura	spadek	liście	9
PT	prenylotransferaza	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28
		susza/wysoka temperatura	spadek	liście	9
HS	syntaza humuloniu	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28
		susza/wysoka temperatura	spadek*	liście	9

HLVd – wiroid utajony chmielu; \*reakcja obserwowana u części z badanych odmian

Źródło: opracowanie własne

Tabela 2

Zmiany w aktywności genów kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę związków polifenolowych w chmielu

Gen	Enzym	Czynnik stresowy	Aktywność genu	Tkanka	Referencje
PAL	liaza fenyloalanina:amoniak	infekcja HLVd	wzrost*	młode szyszki	28
C4H	4-hydroksylaza kwasu cynamonowego	infekcja <i>Verticilium nonalfalfae</i>	spadek	korzenie	35
			wzrost	łodygi	
4CL2	ligaza kwas 4-kumarowy:CoA	infekcja HLVd	bez zmian	młode szyszki	28
CHS_H1	syntaza chalkonowa	infekcja HLVd	wzrost*	młode szyszki	28
		infekcja HSVd	spadek	liście i ogonki liściowe	10
		susza/wysoka temperatura	spadek	liście	9
OMT1	O-metylotransferaza	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28

HLVd – wiroid utajony chmielu; HSVd – wiroid karłowatości chmielu; \*reakcja obserwowana u części z badanych odmian

Źródło: opracowanie własne

Tabela 3

Zmiany w aktywności genów kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę związków terpenowych w chmielu

Gen	Enzym	Czynnik stresowy	Aktywność genu	Tkanka	Referencje
GPPS-SSU	syntaza difosforanu geranylu	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28
FPPS	syntaza farnesylopirofosforanu	infekcja HLVd	wzrost*	młode szyszki	28
MTS	syntaza monoterpenowa	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28
		susza/wysoka temperatura	spadek	liście	9
STS	syntaza seskwiterpenowa	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28
		susza/wysoka temperatura	spadek	liście	9
TPS9	syntaza terpenu	infekcja HLVd	wzrost*	młode szyszki	28
NES	syntaza (E)-nerolidolu/linalolu	infekcja HLVd	bez zmian	młode szyszki	28

HLVd – wiroid utajony chmielu; \*reakcja obserwowana u części z badanych odmian

Źródło: opracowanie własne

Tabela 4

Zmiany w aktywności genów kodujących czynniki transkrypcyjne w chmielu

Gen	Czynnik stresowy	Aktywność genu	Tkanka	Referencje
MYB3	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28
	infekcja HSVd	spadek	liście i ogonki liściowe	10
MYB8	infekcja HLVd	bez zmian	młode szyszki	28
MYB78	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28
bHLH2	infekcja HLVd	bez zmian	młode szyszki	28
	infekcja HSVd	spadek	liście i ogonki liściowe	10
bHLH4	infekcja HLVd	spadek*/wzrost*	młode szyszki	28
WRKY1	infekcja HLVd	spadek*	młode szyszki	28

HLVd – wiroid utajony chmielu; HSVd – wiroid karłowatości chmielu; \*reakcja obserwowana u części z badanych odmian

Źródło: opracowanie własne

### Markery molekularne związane z biosyntezą metabolitów wtórnych

Uzyskanie odmian o wysokiej produkcji kwasów goryczkowych jest jednym z celów hodowli chmielu. Testowanie roślin na zawartość tych związków może zostać wykonane, kiedy rośliny osiągną dojrzałość i wykształcą szyszki, a więc najwcześniej dwa lata po wysadzeniu. Wówczas geny odpowiedzialne za biosyntezę

$\alpha$ - i  $\beta$ -kwasów stają się aktywne. Aby przeprowadzenie selekcji było możliwe we wcześniejszym etapie rozwoju roślin, opracowano markery molekularne związane z cechą wysokiej zawartości kwasów goryczkowych (16, 9). Cerenak i in. (9) opisali 13 rejonów QTL-i (ang. *quantitative trait loci*) związanych z wysoką produkcją  $\alpha$ -kwasów. Żaden z nich nie mapował z genami kodującymi syntazę chalkonową, co pozwala przypuszczać, że wykryte QTL-e są raczej powiązane z czynnikami regulatorowymi dla tych genów.

Zidentyfikowano także QTL-e powiązane z syntezą ksantohumolu i desmetyloksantohumolu (16, 30). W populacji nowozelandzkiej wykryto rejony QTL-i, które były powiązane z syntezą metabolitów wtórnych poprzez oddziaływanie na czynniki transkrypcyjne lub enzymy zaangażowane w późne etapy biosyntezy i modyfikację tych związków (21). Część z QTL-i ma wpływ na produkcję pojedynczych związków, inne na produkcję jednocześnie kwasów goryczkowych, olejków eterycznych oraz polifenoli, a jeszcze inne regulują różne cechy, w tym także te niezwiązane z powstawaniem metabolitów wtórnych.

### Podsumowanie

Chmiel jest bogatym źródłem metabolitów wtórnych, takich jak: polifenole, kwasy goryczkowe i terpenoidy. Związki te powstają w szlakach metabolicznych, których poszczególne etapy są kontrolowane przez liczne enzymy i czynniki transkrypcyjne. Aktywność kodujących je genów warunkuje poziom syntezy metabolitów. Ekspresja genów zależy od genotypu, organu oraz fazy rozwojowej roślin i może podlegać wahaniom pod wpływem działania czynników stresowych. Na potrzeby hodowli opracowano markery molekularne związane z produkcją związków bioaktywnych, a ich zastosowanie ułatwia selekcję pożądaných genotypów.

### Literatura

1. Agacka-Mołodoch M., Skomra U.: Chmiel jako źródło bioaktywnych metabolitów wtórnych dla przemysłu piwowarskiego i farmaceutycznego. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 2012, **31(5)**: 39-50.
2. Berne S., Kovačević N., Kastelec D., Javornik B., Radišek S.: Hop Polyphenols in relation to verticillium wilt resistance and their antifungal activity. *Plants*, 2020, **9**, 1318, doi:10.3390/plants9101318.
3. Bocquet L., Sahpaz S., Hilbert J.L., Rambaud C., Rivière C.: *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. *Phytochemistry Reviews*, 2018, **17**: 1047-1090, doi: 10.1007/s11101-018-9584-y.
4. Castro C.B., Whittock L.D., Whittock S.P., Leggett G., Koutoulis A.: DNA sequence and expression variation of hop (*Humulus lupulus*) valerophenone synthase (VPS), a key gene in bitter acid biosynthesis. *Annals of Botany*, 2008, **102**: 265-273, doi:10.1093/aob/mcn089.
5. Cerenak A., Satovic Z., Javornik B.: Genetic mapping of hop (*Humulus lupulus* L.) applied to the detection of OTLs for alpha-acid content. *Genome*, 2006, **49**: 485-494, doi: 10.1139/g06-007.

6. Cerenak A., Satovic Z., Jakse J., Luthar Z., Carovic-Stanko K., Javornik B.: Identification of QTLs for alpha acid content and yield in hop (*Humulus Lupulus* L.). *Euphytica*, 2009, **170**: 141-154, doi: 10.1007/s10681-009-9920-9.
7. Cheynier V., Comte G., Davies K.M., Lattanzio V., Martens S.: Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, **72**: 1-20, doi: 10.1016/j.plaphy.2013.05.009.
8. Clark S.M., Vaitheeswaran V., Ambrose S.J., Purves R.W., Page J.E.: Transcriptome analysis of bitter acid biosynthesis and precursor pathways in hop (*Humulus lupulus*). *BMC Plant Biology*, 2013, **13**, 12.
9. Eriksen R.L., Padgitt-Cobb L.K., Townsend M.S., Henning J.A.: Gene expression for secondary metabolite biosynthesis in hop (*Humulus lupulus* L.) leaf lupulin glands exposed to heat and low-water. *Scientific Reports*, 2021, **11**, 5138, doi: 10.1038/s41598-021-84691-y.
10. Füssy Z., Patzak J., Stehlik J., Matoušek J.: Imbalance in expression of hop (*Humulus lupulus*) chalcone synthase H1 and its regulators during hop stunt viroid pathogenesis. *Journal of Plant Physiology*, 2013, **170**: 688-695, doi: 10.1016/j.jplph.2012.12.006.
11. Gatica-Arias A., Stanke M., Häntzschel K.R., Matoušek J., Weber G.: Over-expression of the transcription factor HIMYB3 in transgenic hop (*Humulus lupulus* L. cv. Tettnanger) modulates the expression of genes involved in the biosynthesis of flavonoids and phloroglucinols. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2013, **113**: 279-289, doi: 10.1007/s11240-012-0268-9.
12. Gołabczak J., Gendaszewska-Damach E.: Ksantohumol i inne prenyloflawonoidy szyszek chmielu – aspekty biologiczne i technologiczne. *Biotechnologia*, 2010, **1(88)**: 82-96.
13. Hong K., Wang L., Johnpaul A., Lv C., Ma C.: Key Enzymes involved in the synthesis of hops phytochemical compounds: from structure, functions to applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, **22**, 9373. doi: /10.3390/ijms22179373.
14. Jelínek L., Dolečková M., Karabín M., Hudcová T., Kotlíková B., Dostálek P.: Influence of growing area, plant age, and virus infection on the contents of hop secondary metabolites. *Czech Journal of Food Sciences*, 2012, **30(6)**: 541-547.
15. Kocábek T., Mishra A.K., Matoušek J., Patzak J., Lomnická A., Khare M.: The R2R3 transcription factor HIMYB8 and its role in flavonoid biosynthesis in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Science*, 2018, **269**: 32-46.
16. Koie K., Inaba A., Okada I., Kaneko T., Ito K.: Construction of the genetic linkage map and QTL analysis on hop (*Humulus lupulus* L.). *Acta Horti (ISHS)*, 2005, **668**: 59-66, doi: 10.17660/ActaHortic.2005.668.7.
17. Matoušek J., Kocábek T., Patzak J., Briza J., Siglova K., Mishra A.K., Duraisamy G.S., Tycova A., Ono E., Krofta K.: The “putative” role of transcription factors from H1WRKY family in the regulation of the final steps of prenylflavonoid and bitter acids biosynthesis in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Molecular Biology*, 2016, **92**: 263-277, doi: 10.1007/s11103-016-0510-7.
18. Matoušek J., Kocábek T., Patzak J., Füssy Z., Procházková J., Heyerick A.: Combinatorial analysis of lupulin gland transcription factors from R2R3Myb, bHLH and WDR families indicates a complex regulation of chs\_H1 genes essential for prenylflavonoid biosynthesis in hop (*Humulus lupulus* L.). *BMC Plant Biology*, 2012, **12**, 27.
19. Matoušek J., Novak P., Patzak J., Bříza J., Krofta K.: Analysis of true chalcone synthase from *Humulus lupulus* L. and biotechnology aspects of medicinal hops. *Rostlinná Výroba*, 2002a, **48(1)**: 7-14.
20. Matoušek J., Novak P., Bříza J., Patzak J., Niedermeierová H.: Cloning and characterisation of *chs*-specific DNA and cDNA sequences from hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Science*, 2002b, **162**: 1007-1018.

21. McAdam E.L., Freeman J.S., Whittock S.P., Buck E.J., Jakse J., Cerenak A., Javornik B., Kilian A., Wang C.H., Andersen D., Vaillancourt R.E., Carling J., Beatson R., Graham L., Graham D., Darby P., Koutoulis A.: Quantitative trait loci in hop (*Humulus lupulus* L.) reveal complex genetic architecture underlying variation in sex, yield and cone chemistry. *BMC Genomics*, 2013, **14**, 360.
22. Mishra A.K., Duraisamy G.S., Khare M., Kocábek T., Jakse J., Bříza J., Patzak J., Sano T., Matoušek J.: Genome-wide transcriptome profiling of transgenic hop (*Humulus lupulus* L.) constitutively overexpressing HIWRKY1 and HIWDR1 transcription factors. *BMC Genom.*, 2018, **19**, 739.
23. Mishra A.K., Kocábek T., Sukumari Nath V., Awasthi P., Shrestha A., Kumar Killi U., Jakse J., Patzak J., Krofta K., Matousek J.: Dissection of dynamic transcriptome landscape of leaf, bract, and lupulin gland in hop (*Humulus lupulus* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, **21**, 233, doi:10.3390/ijms21010233.
24. Natsume S., Takagi H., Shiraishi A., Murata J., Toyonaga H., Patzak J., Takagi M., Yaegashi H., Uemura A., Mitsuoka C., Yoshida K., Krofta K., Satake H., Terauchi R., Ono E.: The draft genome of hop (*Humulus lupulus*), an essence for brewing. *Plant Cell Physiology*, 2015, **56**(3): 428-441, doi:10.1093/pcp/pcu169.
25. Novák P., Matoušek J., Bříza J.: Valerophenone synthase-like chalcone synthase homologues in *Humulus lupulus*. *Biologia Plantarum*, 2003, **46**(3): 375-381.
26. Okada Y., Ito K.: Cloning and analysis of valerophenone synthase gene expressed specifically in lupulin gland of hop (*Humulus lupulus* L.). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2001, **65**(1): 150-155, doi: 10.1271/bbb.65.150.
27. Paguet S., Siah A., Lefèvre G., Sahpaz S., Rivière C.: Agronomic, genetic and chemical tools for hop cultivation and breeding. *Phytochemistry Reviews*, 2022, **21**: 667-708, doi: 10.1007/s11101-022-09813-4.
28. Patzak J., Henychová A., Krofta K., Svoboda P., Malířová I.: The influence of *Hop Latent Viroid* (HLVd) infection on gene expression and secondary metabolite contents in hop (*Humulus lupulus* L.) glandular trichomes. *Plants*, 2021, **10**(11), 2297, doi: 10.3390/plants10112297.
29. Patzak J., Henychová A., Matousek J.: Developmental regulation of lupulin gland-associated genes in aromatic and bitter hops (*Humulus lupulus* L.). *BMC Plant Biology*, 2021, **21**, 534, doi: 10.1186/s12870-021-03292-z.
30. Patzak J., Henychová A., Krofta K., Nesvadba V.: Study of molecular markers for xanthohumol and DMX contents in hop (*Humulus lupulus* L.) by QTLs mapping analysis. *Brewer Science*, 2012, **65**: 96-102.
31. Pethybridge S.J., Wilson C.R., Hay F.S., Leggett G.W., Sherrieff L.J.: Effect of viruses on agronomic and brewing characteristics of four hop cultivars in Australia. *Annals of Applied Biology*, 2002, **140**: 97-105.
32. Pistelli L., Ferri B., Cioni P.L., Koziara M., Agacka M., Skomra U.: Aroma profile and bitter acid characterization of hop cones (*Humulus lupulus* L.) of five healthy and infected Polish cultivars. *Industrial Crops and Products*, 2018, **124**: 653-662, doi: 10.1016/j.indcrop.2018.08.009.
33. Progar V., Jakše J., Štajner N., Radišek S., Javornik B., Berne S.: Comparative transcriptional analysis of hop responses to infection with *Verticillium nonalfalfae*. *Plant Cell Reports* 2017, **36**: 1599-1613, doi: 10.1007/s00299-017-2177-1.
34. Przybyś M., Skomra U.: Hops as a source of biologically active compounds. *Polish Journal of Agronomy*, 2020, **43**: 83-102.
35. Svára A., Jakse J., Radišek S., Javornik B., Štajner N.: Temporal and spatial assessment of defence responses in resistant and susceptible hop cultivars during infection with *Verticillium nonalfalfae*. *Journal of Plant Physiology*, 2019, **240**, 153008, doi: 10.1016/j.jplph.2019.153008.

- 
36. Xu H., Zhang F., Liu B., Huhman D.V., Sumner L.W., Dixon R.A., Wang G.: Characterization of the formation of branched short-chain fattyacid:CoAs for bitter acid biosynthesis in hop glandular trichomes. *Molecular Plant*, 2013, **6**: 1301-1317.
- 

Adres do korespondencji:

*dr Anna Czubacka*  
*Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin*  
*IUNG-PIB*  
*ul. Czartoryskich 8*  
*24-100 Puławy*  
*tel. 81 4786 933*  
*e-mail: Anna.Czubacka@iung.pulawy.pl*

---

AUTOR	ORCID
Anna Czubacka	0000-0003-1843-6745



**Hanna Olszak-Przybyś**

*Institut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy  
w Puławach*

**METODY STOSOWANE W BADANIACH ZRÓŻNICOWANIA  
ORAZ IDENTYFIKACJI ODMIAN CHMIELU\***

**Słowa kluczowe:** chmiel, identyfikacja odmian chmielu, markery mikrosatelitarne, sekwencjonowanie

---

**Wstęp**

Odrębność każdej odmiany chmielu jest warunkowana przez zespół cech morfologicznych (kształt liści, pokrój rośliny, barwa pędów) i fizjologicznych (wielkość plonu, dynamika wzrostu rośliny, odporność na stres środowiskowy i choroby). Analiza tych cech odbywa się zarówno w systemie wieloletnich doświadczeń polowych, jak również w specjalistycznych laboratoriach, gdzie prowadzone są badania fitochemiczne czy molekularne. W badaniach tych porównuje się analizowane odmiany z wzorcem stanowiącym materiał referencyjny. Właściwa identyfikacja genotypów chmielu jest szczególnie ważna dla hodowców, ponieważ znajomość genetycznego podłoża najważniejszych cech odmianowych umożliwia precyzyjne tworzenie programów i strategii hodowlanych. Stanowi też podstawę funkcjonowania banków genów. Właściwa identyfikacja odmian chmielu jest również istotna dla przemysłu piwowarskiego, który wymaga surowca o zdefiniowanych i pożądanym cechach. W celu sprostania tym wymaganiom wprowadzono procedury kontroli tożsamości odmianowej plantacji produkcyjnych chmielu, jak również surowca chmielowego w postaci wysuszonych szyszek i granulatu.

**Metody oparte na obserwacji cech morfologicznych roślin**

W celu ustalenia odrębności odmianowej chmielu stosuje się szereg tradycyjnych metod, w tym ocenę fenotypową roślin. Taka ocena prowadzona jest najczęściej na

---

\*Opracowanie wykonano w ramach zadania 6.3 pt. „Upowszechnianie wiedzy o wynikach uzyskiwanych w ramach realizacji zadania (hodowla i nasiennictwo chmielu i tytoniu)” z dotacji budżetowej przeznaczonej na realizację zadań MRiRW w 2022 r.



etapie wzrostu chmielu na plantacji, na podstawie obserwacji wybranych, charakterystycznych cech morfologicznych danej rośliny, takich jak: pokrój, barwa pędów, kształt liści oraz wielkość i kształt szyszek. Davis (4) w swojej pracy uwzględnił siedem podstawowych cech morfologicznych, na podstawie których prowadził identyfikację odmianową chmielu. Zauważył jednak, że metody obserwacyjne choć są skuteczne, mają też poważne wady. Przede wszystkim są czasochłonne i wymagają dużego doświadczenia obserwatora. Dodatkowo zarówno cechy morfologiczne, jak i fizjologiczne zależą nie tylko od zapisu genetycznego, ale również od warunków środowiska, dlatego mogą w pewnych granicach zmieniać się w zależności od rejonu lub roku uprawy. Na przykład takie cechy, jak: wielkość plonu, wysokość roślin, intensywność zabarwienia liści czy wielkość szyszek, zmieniają się wraz z nasłonecznieniem, sposobem uprawy czy czasem zbioru. Čerenak i in. (3) wykazali, że zmienne warunki środowiskowe mogą wpływać na cechy morfologiczne oraz skład chemiczny roślin i w konsekwencji utrudniać poprawną identyfikację odmian chmielu, szczególnie gdy ocenę prowadzi się w różnych regionach geograficznych. Wiarygodną identyfikację genotypów chmielu opartą na obserwacji roślin utrudnia również duże podobieństwo odmian, szczególnie kiedy rośliny znajdują się we wczesnych fazach rozwojowych, gdyż wiele kluczowych cech ujawnia się dopiero podczas dojrzewania szyszek. W sytuacji, kiedy zachodzi potrzeba rozpoznania młodych roślin chmielu bądź surowca w postaci wysuszonych i sprasowanych szyszek czy granulatu, metody obserwacyjne bazujące na porównywaniu cech morfologicznych są nieskuteczne, dają bowiem niejednoznaczne wyniki.

### Metody oparte na badaniach fitochemicznych

W ostatnich latach obserwuje się rosnące zainteresowanie możliwościami identyfikacji odmianowej chmielu przy użyciu metod chemicznych, głównie technik chromatografii gazowej (GC, ang. *gas chromatography*) i wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC, ang. *high-performance liquid chromatography*). Tego typu analizy pozwalają na określenie zawartości metabolitów wtórnych chmielu, takich jak: kwasy goryczkowe, olejki eteryczne czy polifenole. Skład metabolitów wtórnych w chmielu jest warunkowany genetycznie i charakterystyczny dla każdej odmiany (19, 23, 37, 52). Na przykład czeska odmiana Saaz wyróżnia się wysoką zawartością  $\beta$ -farnezeny (37), odmiana Magnum zawiera dużą ilość kwasu p-kumarowego (9), natomiast odmianę Nugget cechuje wyjątkowo wysoka zawartość kohumulonu (21). Pozyskanie danych dotyczących składu jakościowego i ilościowego związków chemicznych zawartych w odmianach chmielu umożliwia precyzyjne rozróżnianie tych odmian. Niektórzy autorzy proponują chromatograficzne metody identyfikacji genotypów chmielu oparte wyłącznie na zawartości specyficznych składników olejków eterycznych (6, 36). Inni badacze oprócz olejków wykorzystują w diagnostyce kwasy goryczkowe (20). Z kolei De Comman i in. (5) oprócz kwasów goryczkowych

i olejków badali również zawartość flawonoidów. W ten sposób scharakteryzowali pod względem chemicznym odmiany chmielu, takie jak: Saaz, Wye Target i Nugget. Jelínek i in. (17) testowali metodą chromatografii siedem czeskich odmian chmielu, w których analizowali zawartość alfa i beta kwasów, olejków eterycznych i pojedynczych polifenoli. Otrzymane wyniki poddali ocenie statystycznej, która pozwoliła na wyodrębnienie odmian o podobnym składzie chemicznym. W swojej pracy udowodnili też unikalność odmian Agnus i Saaz pod względem zawartości  $\beta$ -farnezeny. Również Patzak i in. (35) podjęli próbę rozróżnienia genotypów chmielu na podstawie właściwości chemicznych. Naukowcy badali poziom alfa i beta kwasów w dzikim chmielu. Zaobserwowali wyraźne różnice w zawartości kohumulonu i kolupulonu pomiędzy genotypami: europejskim i północnoamerykańskim. Poziom kohumulonu w alfa kwasach dzikiego chmielu północnoamerykańskiego był znacznie wyższy niż w dzikim chmielu europejskim. Wspólną cechą wszystkich analiz chemicznych opartych na chromatografii jest to, że porównują one skład poszczególnych związków chemicznych badanej próbki ze składem próbek referencyjnych (10, 25) lub odpowiednimi wzorcami. Do celów identyfikacyjnych niezbędne są nie tylko badania jakościowe, ale również ilościowe charakterystycznych związków chemicznych. Uzyskane wyniki mogą być analizowane przy użyciu różnych metod. Na podstawie referencyjnej bazy danych można skonstruować schemat blokowy (20, 24), w którym określa się przedziały zawartości wybranych związków charakterystyczne dla poszczególnych odmian chmielu. Badana próbka charakteryzująca się określonymi zawartościami poszczególnych związków trafia do jednej z grup w bloku reprezentujących konkretną odmianę. Można również zastosować równoległe porównywanie kompozycji olejków eterycznych, gdzie poszczególne składniki są przedstawiane graficznie, najczęściej modelem typu MIN-MAX (18). Badane składniki olejków eterycznych nanosi się na oś odciętych, a ich względną zawartość na oś rzędnych. Po naniesieniu na wykres kilku próbek referencyjnych tej samej odmiany uzyskuje się zakres zawartości charakterystyczny dla tej odmiany. Jeśli zawartości poszczególnych składników próbki badanej mieszczą się w zakresach odmiany referencyjnej, oznacza to, że z dużym prawdopodobieństwem należy ona do tej odmiany. Fores i Schmidt (8) pogrupowali i oznaczyli w ten sposób ponad 20 odmian chmielu. Kralj i in. (21), bazując na technikach chromatografii i stosując model MIN-MAX, wyodrębnili 14 grup olejków eterycznych zależnych od genotypu i w ten sposób sklasyfikowali 95 odmian chmielu.

### Metody molekularne

Skład chemiczny szyszek chmielowych jest warunkowany nie tylko genotypem, ale również w dużym stopniu jest modyfikowany przez czynniki środowiskowe. Z tego powodu rozróżnianie odmian chmielu na podstawie parametrów chemicznych bywa zawodne, a w przypadku mieszkanki odmian jest wręcz niemożliwe. W takiej

sytuacji przydatne stają się techniki biologii molekularnej oparte na badaniach kwasów nukleinowych (DNA), które mogą ostatecznie potwierdzić rezultaty uzyskane na podstawie badań morfologicznych i chemicznych. Badanie odrębności genetycznej odmian chmielu technikami molekularnymi sprowadza się w istocie do poznania stopnia pokrewieństwa albo dystansu genetycznego wyrażanego poprzez poziom zróżnicowania sekwencji DNA w poszczególnych genotypach. Nawet odmiany bardzo podobne do siebie fenotypowo i charakteryzujące się zbliżonym składem związków chemicznych w tkankach wykazują różnice w budowie DNA. Techniki molekularne bardzo dobrze sprawdzają się w identyfikacji odmian, które uzyskano zarówno w drodze selekcji, jak i krzyżowania lub transformacji genetycznej. Ponadto metody, których podstawą są analizy DNA mają przewagę nad pozostałymi, gdyż umożliwiają identyfikację niezależnie od fazy rozwojowej badanych obiektów. Obecnie diagnostyka oparta na badaniu DNA odgrywa coraz większą rolę w ochronie zasobów genowych, identyfikacji linii hodowlanych oraz badaniach nad zmiennością genetyczną. Markery molekularne są szeroko wykorzystywane do genetycznego rozróżniania osobników zarówno na poziomie międzygatunkowym, jak również w obrębie danego gatunku czy populacji. Bardzo intensywnie rozwija się również hodowla molekularna, która wykorzystuje markery molekularne sprzężone z genami warunkującymi cechy fenotypowe do selekcji pożądanych genotypów. Do metod molekularnych sięga się również w diagnostyce chorób roślin w celu wykrycia i identyfikacji czynników chorobotwórczych. Idealne markery molekularne powinny odznaczać się wysokim stopniem polimorfizmu, dużą specyficznością oraz kodominującym charakterem dziedziczenia (49). Ponadto dobry marker genetyczny powinien być wykrywalny w prosty i szybki sposób. Powinien też wykazywać neutralność selekcyjną niezależną od czynników zewnętrznych i być równomiernie rozłożony w genomie. Istnieje szereg podziałów markerów, jak również metod genotypowania (30, 43, 47). Według Sztuby-Solińskiej (47) techniki oparte na analizie DNA można podzielić na techniki hybrydizacyjne DNA, techniki bazujące na amplifikacji PCR (losowej lub specyficznej) oraz techniki mieszane bazujące na wykorzystaniu endonukleaz restrykcyjnych i PCR. Spośród metod amplifikacji DNA (ang. *polymerase chain reaction*) wykorzystujących markery molekularne metoda RAPD (ang. *random amplified polymorphic DNA* – polimorfizm DNA amplifikowanego losowo) jest najprostszą techniką stosowaną w genetycznych badaniach roślin, w tym również w identyfikacji odmian chmielu. RAPD polega na szybkim powielaniu 1–10 fragmentów polimorficznego DNA o długości 100–200 par zasad. Reakcja amplifikacji prowadzona jest przy użyciu jednego dziesięcionukleotydowego startera o dowolnie wybranej sekwencji nukleotydów. Ze względu na dużą liczbę kombinacji różnych sekwencji starterów metoda RAPD jest często stosowana do mapowania genomów roślinnych, określania pokrewieństwa genetycznego i tworzenia map genetycznych. Marilyn i in. (27) wykorzystali tę technikę do rozróżnienia 7 niedojrzałych odmian chmielu, które wcześniej bez sukcesu próbowano scharakteryzować na podstawie

składu olejków eterycznych. Z kolei Tsuchiya i in. (50) użyli metody RAPD do rozróżnienia 12 komercyjnych odmian chmielu oraz potwierdzili jej skuteczność w identyfikowaniu mieszaniny różnych odmian chmielu. Pillay i Kenny (38, 39) prowadzili badania, w których wykorzystali markery RAPD i RFLP do opisanie różnic pomiędzy chmielem uprawnym i dzikim, jak również różnic pomiędzy *Humulus lupulus* a *Humulus japonicus*. Murakami (31) użył 25 markerów RAPD do scharakteryzowania 51 odmian chmielu pochodzących z całego świata. Badane odmiany zakwalifikował do 6 różnych klastrow, a różnice pomiędzy poszczególnymi klastrami wyjaśnił na podstawie zależności genetycznych związanych z ich pochodzeniem. Użyteczność metody RAPD potwierdzili także w swoich badaniach Šuštar-Vozlic i Javornik (48), którzy wykorzystali ją do identyfikacji genetycznej 65 odmian chmielu. Udało im się też przyporządkować poszczególne odmiany do dwóch grup o zróżnicowanym pochodzeniu, tj. europejskiej i północnoamerykańskiej. Podobne badania prowadzili Shigeki i in. (46). Naukowcy identyfikowali odmiany chmielu, wykorzystując markery RAPD, które następnie sekwencjonowali w celu syntezy specyficznych starterów. Za pomocą uzyskanych starterów odróżnili jedenaście odmian chmielu. Co więcej, wykorzystali tę technikę do wykrywania próbek stanowiących mieszanek odmian chmielu. Przydatność techniki RAPD w identyfikacji genotypów chmielu została też potwierdzona w pracach Patzaka i in. (34) oraz Murakami (32). Obecnie technika RAPD nie jest już szeroko wykorzystywana. Niska powtarzalność metody wynikająca z obniżonej temperatury przyłączania starterów podczas reakcji PCR spowodowała odejście od markerów RAPD na rzecz innych markerów molekularnych.

Metoda AFLP (ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism* – polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów) łączy w sobie zalety RAPD oraz techniki RFLP (ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism* – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych) opracowanej w 1974 r. przez Grodzicker i współpracowników (11). Początek technice AFLP nadał Zabeau (56), który w 1993 r. opatentował metodę SRFA (ang. *Selective Restriction Fragment Amplification*), natomiast autorem ostatecznego kształtu i nazwy metody był Vos (51). Metoda AFLP daje możliwość szybkiego uzyskania wyników, ale również gwarantuje wysoką powtarzalność. Najważniejsze jednak, że w odróżnieniu od wielu technik molekularnych opartych na metodzie PCR zastosowanie AFLP nie wymaga wcześniejszej znajomości sekwencji badanego DNA. Markery AFLP uzyskuje się poprzez trawienie identyfikowanego DNA dwoma enzymami restrykcyjnymi różniącymi się częstotliwością rozpoznawania miejsc restrykcyjnych. Do tego celu najczęściej stosuje się enzymy restrykcyjne *EcoRI* i *MseI* trawiące DNA odpowiednio z małą oraz dużą częstotliwością. Przeprowadzone w ten sposób trawienie prowadzi do wygenerowania dużej liczby fragmentów DNA, do których następnie dołączane są 10–30-nukleotydowe adaptory. Sekwencje adaptorów oraz miejsc pozostałych po trawieniu są rozpoznawane przez komplementarne do nich startery. W kolejnych etapach następuje dwukrotna ampli-

fikacja fragmentów: preamplifikacja oraz selektywna amplifikacja. Dzięki temu, że startery mają na końcach 3' dodatkowe nukleotydy, następuje selekcja powielanych fragmentów. Na etapie preamplifikacji startery posiadają po jednym dodatkowym nukleotydzie, ale już przy drugiej amplifikacji startery mają aż po trzy dodatkowe nukleotydy. Liczba nukleotydów obecnych przy końcu 3' startera użytego w ostatnim etapie analizy AFLP warunkuje liczbę otrzymanych fragmentów DNA. Im jest ich mniej, tym liczba uzyskanych fragmentów DNA jest większa. Technika AFLP jest droższa od RAPD, jednak ze względu na możliwość analizy wielu *loci* jednocześnie, rzeczywisty koszt przypadający na jeden marker jest niższy. Podsumowując, takie cechy opisywanej metody, jak wysoka czułość, wydajność w generowaniu dużej liczby fragmentów DNA, jak również możliwość identyfikacji bardzo dużej liczby polimorficznych nukleotydów i powtarzalność sprawiły, że technika oparta na markerach AFLP znalazła zastosowanie w identyfikacji zarówno zmienności sekwencyjnej, jak i metylacyjnej. Powstało szereg prac badawczych wykorzystujących markery AFLP do oceny podobieństwa genetycznego różnych gatunków roślin użytkowych, w tym również odmian chmielu. Hartl i Seefelder (12) w swoich badaniach oznaczyli osiem niemieckich odmian chmielu. Użyli 60 markerów w ośmiu kombinacjach i uzyskali 523 fragmenty AFLP, z których 145 odznaczało się polimorfizmem. Badacze nie zaobserwowali jednak różnic między odmianami Saazer, Spalter i Tettninger. W związku z tym przyjęli, że odmiany te pochodzą z hodowli selekcyjnej genetycznie homogenicznej populacji. Fakt, że testowane odmiany wykazały duże podobieństwo zarówno w cechach morfologicznych, jak i w składzie chemicznym, stanowi potwierdzenie, że ich genomy różnią się od siebie jedynie niewielkim regionem. Również Fleischer i in. (7) udowodnili, że technika AFLP jest użytecznym narzędziem do określania poziomu zmienności genetycznej zarówno w obrębie jednej odmiany chmielu, jak również pomiędzy odmianami. Badacze testowali odmianę Tettninger, której pochodzenie genetyczne było dotychczas nieznanne. Przy użyciu zestawu sześciu kombinacji starterów przeanalizowali reprezentatywną próbę 279 osobników pochodzących z tej odmiany i w ten sposób ocenili poziom jej zmienności genetycznej. Dodatkowo porównali odmianę Tettninger z 16 pokrewnymi odmianami chmielu. Badania prowadzili na materiale genetycznym, który uzyskali z liści, szyszek i osadek chmielu. Wykazali, że wszystkie źródła materiału roślinnego dają powtarzalne wyniki, tym samym potwierdzili przydatność metody w analizach różnego rodzaju materiału genetycznego. Dotychczas markery AFLP były częstym narzędziem stosowanym w celu oceny stopnia zróżnicowania genetycznego wśród odmian chmielu oraz określenia źródeł ich pochodzenia (13, 42). Powstałe publikacje wyróżniają zazwyczaj dwie główne grupy odmian, które odzwierciedlają ich pochodzenie. Pierwszą grupę stanowią genotypy aromatyczne wywodzące się od odmiany botanicznej *Humulus lupulus* var. *lupulus*, powszechnie występującej na terenie Europy, natomiast druga grupa obejmuje odmiany goryczkowe pozyskane na drodze krzyżowania form europejskich z genotypami północnoamerykańskimi.

Metodą podobną do AFLP jest technika DArT (ang. *Diversity Arrays Technology*), która zamiast frakcjonowania produktów reakcji PCR, np. na żelu akrylamidowym, wykorzystuje hybrydyzację badanego DNA z sondami umieszczonymi na mikromacierzach. Źródłem zmienności w technice DArT jest polimorfizm pojedynczych nukleotydów SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*), zmiany insercyjno-delecyjne (InDel), zmiany w metylacji DNA oraz sekwencje powtórzeniowe (44). Podobnie jak AFLP technika DArT nie wymaga znajomości sekwencji DNA. Wymaga natomiast opracowania bibliotek genomowych w celu uzyskania sond. Etap tworzenia sond jest najbardziej pracochłonną częścią tej techniki. Wadą metody DArT jest potencjalne ryzyko użycia w analizie identycznych sond. Ponieważ sondy nie są sekwencjonowane, nie można wykluczyć, że sondy o identycznej sekwencji zostaną zastosowane kilka razy, co może spowodować znaczne zmniejszenie liczby użytecznych markerów (14). Kolejnym ograniczeniem techniki DArT jest dominujący charakter markerów DArT oraz ograniczona pojemność mikromacierzy. Zaletę metody stanowią natomiast wewnętrzne kontrole, które zapewniają dokładność i wiarygodność wyników nawet do ok. 99,8% (54). Procedura DArT polega na izolacji genomowego DNA, a następnie jego trawieniu endonukleazami restrykcyjnymi wrażliwymi na metylację cytozyny. Najczęściej stosuje się enzymy typu *Pst* I, *Rag* I oraz *Bst* NI. Dzięki użyciu *Pst* I generowane są fragmenty DNA, które pochodzą głównie z rejonów kodujących genomu. Na kolejnym etapie analizy do uwolnionych fragmentów dołączane są adaptory (syntetyczne dupлекsy DNA), które umożliwiają powielenie fragmentów. Powielone fragmenty o określonej masie cząsteczkowej są następnie klonowane, a wektory zawierające sklonowane fragmenty służą do tworzenia sond na mikromacierzach. Pierwotnie metodę DArT opracowano dla diploidalnego genomu ryżu (1). Obecnie technika wykorzystywana jest dla dowolnych gatunków, w tym także dla chmielu. Pierwsze badania nad chmielem z wykorzystaniem markerów DArT prowadzili Howard i in. (13). Przy zastosowaniu 720 polimorficznych markerów naukowcy zidentyfikowali 92 odmiany chmielu, które pochodziły z Europy, Ameryki i Australii. Wśród testowanych odmian wyodrębnili i scharakteryzowali dwie główne pule genetyczne: północnoamerykańską i europejską. Zaobserwowali dużą rozbieżność między grupą północnoamerykańską a grupą europejską i mieszańcami. Wszystkie genotypy chmielu północnoamerykańskiego zostały zgrupowane w jednym klastrze, podczas gdy drugi klaster zawierał zarówno genotypy europejskie, jak i mieszańcowe. Naukowcy, bazując na metodzie średnich połączeń (UPGMA, ang. *unweighted pair group method with arithmetic mean*), stwierdzili, że genotypy mieszańcowe wykazują większe podobieństwo genetyczne do genotypów europejskich niż do północnoamerykańskich. McAdam (29) również zastosował technologię DArT do genotypowania odmian chmielu. Zidentyfikował 1241 polimorficznych markerów dla 497 badanych odmian. Wykonana analiza filogenetyczna pozwoliła na wyodrębnienie dwóch puli genowych: europejskiej i północnoamerykańskiej, przy czym wykazała wyraźną genetyczną odrębność mieszańców. Uzyskane zależności genetyczne zgadzały się

z aktualną wiedzą na temat filogenetyki chmielu, co pozwoliło badaczom potwierdzić przydatność technologii DArT do identyfikacji odmianowej chmielu.

Sekwencje mikrosatelitarne (STR, ang. *short tandem repeats*) są to proste, tandemowe powtórzenia składające się z jednego do sześciu nukleotydów. Liczba powtórzeń określonego motywu wynosi zazwyczaj od 10 do 50, natomiast łączna długość sekwencji mikrosatelitarnej waha się w granicach od 60 do 400 par zasad. Mikrosatelity występują głównie w obrębie niekodujących fragmentów DNA, ale można je również znaleźć w sekwencjach kodujących oraz w obszarach pozagenowych. Sekwencje mikrosatelitarne dziedziczą się zgodnie z prawami Mendla, a ich funkcje polegają głównie na regulacji aktywności genów oraz uczestniczeniu w procesach metabolicznych cząsteczek DNA. Główną zaletą markerów mikrosatelitarnych jest wysoki poziom polimorfizmu, czyli występowanie w populacji kilku lub nawet kilkunastu różnych form alleli danej sekwencji. Kolejną zaletą mikrosatelit jest ich kodominujący charakter umożliwiający rozróżnianie u heterozygot komponentów pochodzących od form rodzicielskich. Prosty model dziedziczenia oraz szybka metoda analizy umożliwiają szerokie zastosowanie tych markerów w różnych dziedzinach nauki, w tym również w hodowli i identyfikacji osobniczej – także odmian chmielu. Pierwsze badania przy użyciu markerów mikrosatelitarnych w chmielu prowadzili Brady i in. (2). Wytypowali oni 4 markery przydatne w określeniu stopnia zróżnicowania genetycznego pomiędzy chmielem dzikim i uprawnym. Čerenak i in. (3) udowodnili, że 5 par polimorficznych markerów mikrosatelitarnych wystarczy żeby rozróżnić 63 odmiany chmielu (wyjątek stanowiły odmiany uzyskane w drodze selekcji lub mutacji). Również Jakš e i in. (15) podjęli próbę określenia różnorodności genetycznej dzikich odmian chmielu w porównaniu z chmielem uprawnym. W swojej pracy ocenili zmienność genetyczną markerów AFLP i mikrosatelitarnych dla 124 odmian chmielu dzikiego (z Europy, Azji i Ameryki Północnej) oraz chmielu uprawnego (były to zarówno odmiany, jak i linie hodowlane). Zidentyfikowali łącznie 63 allele, przy czym największą ich liczbę wykryli w grupie dzikich odmian chmielu pochodzących z terenów Europy. Z kolei największą liczbę alleli unikatowych zanotowali dla genotypów chmielu dzikiego wywodzącego się z obszaru Ameryki. Tak duża liczba wykrytych alleli unikatowych świadczy o wysokiej różnorodności genetycznej amerykańskiej puli genowej. Badacze skonstruowali również dendrogram, w którym wyróżniono 10 różnych klastrow zawierających identyfikowane genotypy. Otrzymane w wyniku analizy skupień klastry odzwierciedlały związki pomiędzy geograficznym pochodzeniem poszczególnych genotypów chmielu. Największą odrębność genetyczną stwierdzono w przypadku dzikich odmian chmielu amerykańskiego, które na drzewie filogenetycznym utworzyły jedno odległe skupienie. Co więcej, naukowcy w swojej pracy dokonali porównania zmienności genetycznej badanych genotypów chmielu określonej przy użyciu markerów mikrosatelitarnych i AFLP. Skonstruowane metodą UPGMA dendrogramy wykazały niską korelację pomiędzy dwoma rodzajami markerów. Drzewko filogenetyczne stworzone na pod-

stawie markerów mikrosatelitarnych charakteryzowało się poprawnym grupowaniem spokrewnionych ze sobą genotypów. Z kolei dendrogram wygenerowany z wykorzystaniem markerów AFLP nie tylko dużo lepiej odzwierciedlał stopnie pokrewieństwa ściśle związanych ze sobą genotypów, ale również dawał możliwość rozróżnienia geograficznego. W kolejnych badaniach Jakše i in. (16), wykorzystując 26 komercyjnych odmian chmielu oraz 10 dzikich osobników, zaprojektowali nowe markery mikrosatelitarne, a następnie sprawdzili ich przydatność do identyfikacji genotypów chmielu. Spośród 34 testowanych par markerów 27 z powodzeniem amplifikowało, dlatego wykorzystano je do rozróżniania odmian chmielu. Zastosowane markery mikrosatelitarne umożliwiły wyraźny podział testowanych genotypów chmielu w zależności od regionu ich pochodzenia, typu użytkowego oraz rodowodu. Podobne badania prowadzili Stajner i in. (45), którzy opracowali 25 markerów mikrosatelitarnych. Przy ich użyciu dokonali oceny polimorfizmu 67 odmian chmielu, w tym 34 odmian uprawnych oraz 33 dzikich osobników. Zaprojektowane przez nich markery wzbogacone o motywy GA, GT, ACA, AGA, CAG i ACTC amplifikowały 256 alleli w 25 *loci*, średnio 10,6 allela na jeden *locus*. Uzyskana wysoka wartość wskaźnika polimorfizmu (PIC, ang. *Polymorphic Information Content*) dla użytych markerów świadczy o tym, że są one wysoce przydatne w mapowaniu genomu chmielu oraz identyfikacji odmianowej. Również w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach prowadzono badania nad wykorzystaniem markerów mikrosatelitarnych do określenia tożsamości odmian chmielu uprawianego w Polsce (22). W toku badań wytypowano zestaw sześciu markerów molekularnych (H1AGA7, H1AGA8, H1GA23, H1GA27, H1GT16, H1GT17), które amplifikowano w dwóch multipleksowych reakcjach PCR. Badaniom poddano dziewięć odmian chmielu, w tym: pięć odmian polskich (Lubelski, Marynka, Sybilla, Iunga i Lomik) i cztery odmiany niemieckie (Hallertauer Taurus, Hallertauer Tradition, Perle i Hallertauer Magnum). Zastosowane markery mikrosatelitarne okazały się być polimorficzne dla wszystkich badanych odmian chmielu. Ogółem amplifikowano 31 alleli. Najbardziej przydatny w rozróżnianiu dziewięciu odmian chmielu był marker H1GT17, który charakteryzował się wysoką wartością PIC i niską wartością prawdopodobieństwa identyczności (PI, ang. *Probability of Identity*). Badacze w swojej pracy dowiedli, że użycie wyżej wymienionych markerów umożliwia nie tylko precyzyjną identyfikację odmian chmielu, ale daje również możliwość wiarygodnej identyfikacji surowca chmielowego zarówno w postaci wysuszonych szyszek, jak i granulatu. W pracy analizowano materiał jednorodny pochodzący z jednej odmiany, jak również mieszanki złożone z szyszek dwóch odmian (Marynka i Lubelski) wymieszanych w różnych proporcjach. Z sukcesem zidentyfikowano mieszankę z 10% udziałem innej odmiany w surowcu. W przypadku domieszek niższych niż 10% zaobserwowano zanikanie alleli, natomiast domieszek stanowiących poniżej 1% nie udało się wykryć. Oceniono, że wysoka czułość metody, pozwalająca na wykrycie nawet niewielkich domieszek obcych odmian w surowcu,



daje szerokie możliwości wykorzystywania tej techniki zarówno w celach badawczych, jak i komercyjnych. Ten sam zespół naukowców prowadził również badania, których celem była ocena zróżnicowania genetycznego polskich odmian chmielu na tle odmian zagranicznych zgromadzonych w banku genów rodzaju *Humulus* w IUNG-PIB. Przebadano materiał roślinny pobrany ze 103 odmian chmielu, w tym 20 odmian polskich. W badaniach genetycznych wykorzystano 20 markerów mikrosatelitarnych odznaczających się wysokim poziomem polimorfizmu, które amplifikowano w 8 reakcjach multiplex PCR. Z ich udziałem wykryto łącznie 176 alleli (średnio 8,8 na *locus*). Najbardziej polimorficzny był marker H1GA23, który amplifikował 16 alleli, natomiast najmniej – marker 10316303, który amplifikował zaledwie 3 allele. Wyniki genotypowania wykorzystano do obliczenia frekwencji alleli oraz ich efektywnej liczby ( $N_e$ , ang. *Effective number of alleles*). Na podstawie frekwencji alleli wyliczono dwa wskaźniki polimorfizmu: wskaźnik wartości polimorfizmu (PIC) i prawdopodobieństwo identyczności (PI). Wykazano, że najbardziej przydatnym markerem do odróżniania odmian był *locus* H1GT17. Wykonano również analizę struktury genetycznej, która wykazała obecność dwóch grup genetycznych. Określono je jako europejską i amerykańską pulę genową. Amerykańska pula genowa stanowiła ponad 70% wszystkich badanych odmian chmielu. Analiza struktury genetycznej wykazała również obecność odmian o mieszanym pochodzeniu. Większość z nich stanowiły odmiany użytkowe uzyskane na drodze krzyżowań międzyodmianowych. Dendrogram skonstruowany metodą przyłączania sąsiadów (NJ, ang. *Neighbor-Joining*) wykazał obecność dwóch klastrów: europejskiego i mieszanego. Klaster europejski skupił odmiany europejskie o aromatycznym typie użytkowym. Klaster mieszany zgrupował odmiany pochodzenia amerykańskiego o goryczkowym typie użytkowym oraz odmiany o genotypie mieszanym z wyraźnym udziałem puli genowej północnoamerykańskiej. Badacze stwierdzili wysokie zróżnicowanie genetyczne wśród odmian polskiej hodowli i określili podobieństwo genetyczne pomiędzy odmianami polskimi i zagranicznymi.

Do badań zróżnicowania genetycznego chmielu na podstawie jego rDNA wykorzystywano również markery molekularne polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP, ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Technika RFLP jest metodą hybrydacyjną i polega na trawieniu genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi. Endonukleazy rozpoznają określone miejsca (4–6 par zasad) i specyficznie trawią DNA. Produkty trawienia są następnie rozdzielane elektroforetycznie na żelu agarozowym i nanoszone na naładowane dodatkowo membrany. Polimorfizm jest rozpoznawany za pomocą sond (krótkich, znakowanych odcinków DNA), które są komplementarne do homologicznych fragmentów DNA znajdujących się na membranie. Identyfikowanym źródłem zmienności w tej metodzie są mutacje w obrębie miejsc trawienia oraz potencjalne modyfikacje zasad azotowych. Różnorodność genetyczna może być też wynikiem wystąpienia delecji i insercji lub różnic w liczbie sekwencji powtórzonych, zawartych pomiędzy miejscami trawienia. Technika RFLP umożliwia

identyfikację wielu *loci* jednocześnie. Markery RFLP cechuje kodominujący charakter dziedziczenia oraz możliwość rozpoznawania dominujących i recesywnych alleli, z tego względu są one przydatne w selekcji materiałów hodowlanych i tworzeniu map genetycznych. Mapy te są następnie uzupełniane markerami genowymi za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy DNA. Technikę RFLP wykorzystali w swojej pracy Pillay i Kenny (40), którzy w ten sposób ocenili zmienność genetyczną chmielu zwyczajnego (*Humulus lupulus* L.) i dzikiego. Badacze wykryli, że w rDNA chmielu znajdują się dwa warianty długości 10,3 i 9,3 tysięcy par zasad, reprezentowane przez trzy fenotypy: A, B i C. Przeprowadzone przez nich mapowanie miejsc restrykcyjnych wykazało, że rDNA chmielu jest strukturalnie podobne do rDNA większości roślin wyższych, a długości powtórzeń rDNA u różnych genotypów chmielu są w dużym stopniu jednorodne. Fenotyp A okazał się być charakterystyczny dla dzikich i uprawnych chmieli pochodzących z Europy i Azji. Fenotyp B dominował w odmianach północnoamerykańskich, natomiast fenotyp C wystąpił tylko w rodzimym chmielu północnoamerykańskim i stanowił tym samym potencjalny marker molekularny służący do identyfikacji amerykańskiej puli genowej. Wyniki badań przeprowadzonych przy udziale markerów RFLP dostarczyły dowodów na to, że północnoamerykańskie odmiany chmielu wywodzą się ze skrzyżowania genotypów europejskich z miejscowymi – północnoamerykańskimi.

### Metody genetyczne

Współczesne metody identyfikujące polimorfizm wykorzystują głównie różne techniki sekwencjonowania. Pierwsze, szybkie i stosunkowo wydajne procedury sekwencjonowania kwasów nukleinowych opracowano w drugiej połowie lat 70. ubiegłego wieku; dziś znane są pod nazwą sekwencjonowania pierwszej generacji. Wówczas niemal równocześnie wprowadzono na rynek dwie techniki umożliwiające poznanie sekwencji zasad w DNA, tj. metodę chemicznej degradacji DNA zaproponowaną przez Maxama i Gilberta (28) oraz metodę terminacji łańcucha stworzoną przez zespół Sangera (41). Początkowo obie techniki cieszyły się jednakowym uznaniem, jednakże ostatecznie to metoda Sangera stała się bardziej powszechna i popularna, między innymi ze względu na możliwość automatyzacji. W kolejnych latach technika zaproponowana przez Sangera ulegała licznym modyfikacjom, na przykład poprzez zastosowanie znaczników fluorescencyjnych, rekombinowanych polimeraz czy zastąpienie żeli poliakrylamidowych automatycznymi sekwenatorami. Konwencjonalna metoda Sangera bazuje na właściwościach dideoksynukleotydów, czyli nukleotydów nieposiadających grupy hydroksylowej. W czasie procesu przyłączania dideoksynukleotydu do nowo syntetyzowanego DNA dochodzi do zahamowania wydłużania nici z powodu braku grupy hydroksylowej, która jest niezbędna przy tworzeniu wiązania fosfodiesterowego. Matrycę dla sekwencjonowania stanowi w tej metodzie tylko jednoniciowy DNA, natomiast materiałem wyjściowym do sekwencjonowania jest pula

identycznych jednoniciowych cząsteczek DNA. W mieszaninie reakcyjnej oprócz nukleotydów znajdują się również terminatory – dideoksynukleotydy (zmodyfikowane wersje nukleotydów), które są losowo wbudowywane w cząsteczkę DNA. Dzięki temu powstają fragmenty DNA o różnej długości. Sekwencje produktów odczytywane są elektroforetycznie w osobnych kanałach dla każdego nukleotydu. W celu wizualizacji produktów reakcji stosuje się znaczniki fluorescencyjne. Taki sposób odczytu sekwencji umożliwia identyfikację różnych nukleotydów w jednej próbówce, tym samym czyni sekwencjonowanie dużo szybszym i łatwiejszym do wykonania. Po raz pierwszy technikę Sangera zastosowano do poznania sekwencji DNA faga o długości 5,4 tys. nukleotydów. W kolejnych latach zsekwencjonowano w ten sposób setki genomów innych organizmów, w tym także ludzki genom mitochondrialny. Opatentowanie metod sekwencjonowania pierwszej generacji było ogromnym osiągnięciem dla biologii, gdyż od tej pory sekwencjonowanie genomów stało się stosunkowo szybkie i proste. Zaproponowana przez Sangera technika została również wykorzystana w badaniach nad genetycznym pochodzeniem chmielu. Yamauchi (55) rozróżnił w ten sposób 21 odmian chmielu z Europy i USA. Porównał dane sekwencyjne pod kątem obecności SNP (polimorfizm pojedynczego nukleotydu, ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) i uznał kombinacje markerów SNP jako przydatne do identyfikacji testowanych odmian chmielu. Co więcej, rozpoznał poprawnie mieszanekę dwóch różnych odmian w przetworzonym surowcu chmielu i wykrył 5% udział jednej odmiany w drugiej. Metoda Sangera jest nadal często używana w laboratoriach jako kontrolna, z uwagi na wysoką dokładność i umiarkowaną długość odczytów sekwencji – zazwyczaj od 500 do 1 000 nukleotydów. Ma jednak pewne niedoskonałości. Jej główną wadą jest brak możliwości multipleksowania i wynikające z tego powodu wysokie koszty sekwencjonowania.

Dążenie do zwiększenia wydajności procesu sekwencjonowania oraz chęć poznania genomów kolejnych gatunków stymulowały badaczy do opracowania nowych technologii pozwalających na podniesienie wydajności i zmniejszenie kosztów. Stworzono wysoko przepustowe sekwenatory umożliwiające jednoczesne sekwencjonowanie milionów fragmentów DNA. Wprowadzono na rynek sekwencjonowanie drugiej i trzeciej generacji, które określane jest wspólnym mianownikiem sekwencjonowania następnej generacji (NGS, ang. *Next Generation Sequencing*). Technologie NGS generują ogromną liczbę wyników, które następnie są przetwarzane z udziałem specjalistycznych bioinformatycznych narzędzi. Ma to ogromne znaczenie, szczególnie dla badań nad genomami roślinnymi, które zazwyczaj charakteryzują się dużymi rozmiarami związanymi z występowaniem poliploidalności oraz obecnością wielu sekwencji niekodujących. W dużym uproszczeniu technika NGS polega na unieruchomieniu na płytce krótkich fragmentów DNA, przyłączeniu badanego DNA, następnie jego namnożeniu i równoczesnym sekwencjonowaniu. W technologii NGS można stosować różne sposoby odczytu sekwencji: sekwencjonowanie przez ligację oraz sekwencjonowanie przez syntezę. Do metod sekwencjonowania opartych na syntezie należy technologia firmy Illumina opatentowana w 2006 r. Metoda ta

obejmuje trzy główne etapy: przygotowanie bibliotek DNA, amplifikację fragmentów DNA oraz sekwencjonowanie z zastosowaniem fluorescencyjnie znakowanych nukleotydów. Obecnie technologia Illuminy jest szeroko stosowana w badaniach genetycznych. Natsume i in. (33) wykorzystali tę metodę do sekwencjonowania genomów dwóch odmian chmielu: Saazer i Shinshu Wase oraz dzikiego chmielu japońskiego (*H. lupulus* var. *cordifolius*). Udało im się uzyskać 80% sekwencji genomu odmiany Shinshu Wase. Dodatkowo, stosując technikę sekwencjonowania RNA (RNA-Seq), zidentyfikowali geny zaangażowane w procesy metaboliczne związane z biosyntezą związków odpowiadających za aromat testowanych odmian. Z kolei Wang i in. (53), wykorzystując technikę sekwencjonowania przez syntezę, opisali kompletny genom chloroplastowy chińskiej odmiany chmielu Fubei-1, jednocześnie określając jej pokrewieństwo z innymi taksonami z rodziny *Cannabaceae*. Wykonana analiza filogenetyczna wskazała na bliskie pokrewieństwo pomiędzy odmianą Fubei-1 i odmianami Saazer oraz Hallertauer. Podobne badania prowadzili również Ling i Zhang (26), którzy opisali i scharakteryzowali sekwencję genomu chloroplastowego *H. yunnanensis*, endemicznego gatunku chmielu pochodzącego z Chin. Za pomocą sekwencjonowania następnej generacji określili wielkość genomu tego gatunku (153,612bp) oraz opisali 112 unikatowych genów, w tym: 78 genów kodujących białka, 30 genów tRNA i 4 geny rRNA. Przeprowadzili również analizę filogenetyczną, która wykazała, że *H. yunnanensis* jest bliżej spokrewniony z *H. scandens* niż z *H. lupulus*.

### Podsumowanie

Jeszcze kilkanaście lat temu metodami najczęściej wykorzystywanymi do identyfikacji odmian chmielu były proste techniki obserwacyjne polegające na rozpoznawaniu i rozróżnianiu charakterystycznych cech fenotypowych roślin. Następnie w celu rozróżnienia genotypów chmielu zaczęto stosować metody chemiczne oparte głównie na chromatografii gazowej i wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz proste techniki molekularne wykorzystujące markery molekularne typów: AFLP, RFLP czy RAPD. Obecnie coraz większą rolę w identyfikacji i genetycznej charakterystyce odmian chmielu zaczynają odgrywać nowoczesne technologie sekwencjonowania. Dynamiczny rozwój NGS stwarza badaczom szerokie możliwości szybkiego poznawania sekwencji DNA całych genomów, co z kolei ułatwia identyfikację odmianową oraz pomaga w określeniu związków rodowodowych.

### Literatura

1. Akbari M., Wenzl P., Caig V., Carling J., Xia L., Yang S., Uszyński G., Mohler V., Lehmensiek A., Kuchel H., Hayden M.J., Howes N., Sharp P., Vaughan P., Rathmell B., Huttner E., Kilian A.: Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, **113**:1409-1420.

2. Brady J.L., Scott M.R., Thomas M.R.: DNA typing of hops (*Humulus lupulus*) through application of RAPD and microsatellite markers sequences converted to sequence tagged sites (STS). *Euphytica*, 1996, **91**: 277-284.
3. Čerenak A., Jakše J., Javornik B.: Identification and Differentiation of Hop varieties using simple sequence repeat markers. *Journal of the ASBC*, 2004, **62**:1-7.
4. Davis E.L.: Variation in cultivated varieties of *Humulus lupulus* L. and its relation to the possible sources of these varieties. Washington University in St. Louis, 1957, p. 13-30.
5. De Cooman L., Everaert E., De Keukeleire D.: Quantitative analysis of hop acids, essentials oils and flavonoids as a clue to the identification of hop varieties. *Phytochemical Analysis* 1998, **9**: 145-150.
6. Eri S., Khoo B.K., Lech J., Hartman T.G.: Direct thermal desorption- gas chromatography and chromatography-mass spectrometry profiling of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oils in support of varietal characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, **48**: 1140-1149.
7. Fleischer R., Horlemann C., Schwekendiek A., Kling C., Weber G.: AFLP fingerprinting in hop: analysis of the genetic variability of the Tettng variety. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2004, **51**: 211-220.
8. Forest A., Schmidt R.: The characterisation and classification of hop varieties. EBC-Symposium on hops, Zoeterwoude, The Netherlands, 1994, p. 251-269.
9. Goiris K., Sryn E., Jaskula B., Van Opstaele F., De Rouck G., De Cooman L.: Hop polyphenols: potential for beer flavour and flavour stability. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Prague*, 2005, p. 130-146.
10. Green C.P.: Use of a chromatography data system to identify varieties in binary mixtures of hop. *Journal of the Institute of Brewing*, 1997, **103**: 293-296.
11. Grodzicker T., Williams J., Sharp P., Sambrook J.: Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symposia*, 1974, **39**: 439-446.
12. Hartl L., Seefelder S.: Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, **96**: 112-116.
13. Howard E.L., Whittock S.P., Jakše J., Carling J., Matthews P.D., Probasco G., Henning J.A., Darby P., Čerenak A., Javornik B., Kilian A., Koutoulis A.: High-throughput genotyping of hop (*Humulus lupulus* L.) utilising diversity arrays technology (DArT). *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, **122**: 1265-1280.
14. Jaccound D., Peng K., Feinstein D., Kilian A.: Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research*, 2001, **29**: 4e25.
15. Jakše J., Zlatko S., Javornik B.: Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.) Genome, 2004, **47(5)**: 889-899.
16. Jakše J., Štajner N., Luthar Z., Jeltsch J.M., Javornik B.: Development of transcript-associated microsatellite markers for diversity and linkage mapping studies in hop (*Humulus lupulus* L.). *Molecular Breeding*, 2011, **28**: 227-239.
17. Jelinek L., Sneiderger M., Karabin M., Dostalek P.: Comparison of Czech hop cultivars based on their contents of secondary metabolites. *Czech Journal of Food Sciences*, 2010, **28(4)**: 309-316.
18. Kac M., Kralj D.: Studying biodiversity of hop (*Humulus lupulus* L.) accessions from the composition of their essential oils. *Acta Horticulturae*, 1998, **476**: 313-319.
19. Kenny S.T.: Identification of US-grown hop cultivars by hop acid and essential oil analysis. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1988, **48**: 3-8.
20. Kenny S.T. Identification of US-grown hop cultivars by hop acid and essential oil analyses. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1990, **48(1)**: 3-8.
21. Kralj D., Zupanec J., Vasilj D., Kralj S., Psenicnik J.: Variability of essential oils of hops, *Humulus lupulus* L. *Journal of the Institute of Brewing*, 1991, **97**: 197-206.

22. Korbecka-Glinka G., Skomra U., Olszak-Przybyś H.: Cultivar identification in dry hop cones and pellets using microsatellite loci. *European Food Research and Technology*, 2016, **242**(9). DOI: 10.1007/S00217-016-2715-z
23. Lemmens G.W.C.: The breeding and parentage of hop varieties. *Brewers Diges*, 1998, **(5)**: 16-26.
24. Lermusiaux G., Collin S.: Varietal discrimination of hop pellets. II. Comparison between fresh and aged samples. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 2001, **59**(1): 39-43.
25. Likens S.T., Nickerson G.B.: Identification of hop varieties by gas chromatographic analysis of their essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1967, **15**(5-6): 525-530.
26. Ling L.Z., Zhang S.D.: The complete chloroplast genome of *Humulus yunnanensis* and phylogenetic analysis of the genus *Humulus*. *Mitochondrial DNA B: Resources*, 2019, **4**(2): 2681-2682.
27. Marilyn S., Abbott M.S., Mary J., Fedele M.J.: A DNA-based varietal identification procedure for hop leaf tissue. *Journal of the Institute of Brewing*, 1994, **100**: 283-285.
28. Maxam A.M., Gilbert W.: A new method for sequencing DNA. *PNAS*, 1977, **74**(2): 560-564.
29. McAdam E.: Molecular and quantitative genetic analyses of hop (*Humulus lupulus* L.). University of Tasmania, 2013, **2**: 10-27.
30. Mondini L., Noorani A., Pagnotta M.A.: Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, 2009, **1**(1): 19-35.
31. Murakami A.: Hop variety classification using genetic distance based on RAPD. *Journal of the Institute of Brewing*, 2000a, **106**: 157-161.
32. Murakami A.: Genetic distance based on RAPD and its application to hop breeding. *Breeding Science*, 2000b, **50**: 23-28.
33. Natsume S., Takagi H., Shiraishi A., Murata J., Toyonaga H., Patzak J., Takagi M., Yaegashi H., Uemura A., Mitsuoka Ch.: The draft genome of Hop (*Humulus lupulus*), an essence for brewing. *Plant and Cell Physiology*, 2014, **56**(3): 428-441.
34. Patzak J., Oriniakova P., Matoušek J., Svoboda P.: Czech hop characterization using RAPD method and genetic distance analysis of selected genotypes. *Rostl. Vyr.*, 1999, **45**: 165-172.
35. Patzak J., Nesvadba V., Krofta K., Henychova A., Marzoev A.I., Richards K.: Evaluation of genetic variability of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Canada and the Caucasus region by chemical and molecular methods. *Genome*, 2010, **53**(7): 545-57.
36. Peacock V.E., McCarty P.: Varietal identification of hops and hop pellets. *Technical quarterly – Master Brewers Association of America*, 1992, **29**: 81-85.
37. Perpete P.: Varietal Discrimination of hop pellets by essential oil analysis I. Comparison of fresh samples. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1998, **56**: 104-108.
38. Pillary M., Kenny S.T.: Chloroplast DNA differences between cultivated hop *Humulus lupulus* and the related species *H. japonicus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, **89**: 372-378.
39. Pillary M., Kenny S.T.: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in hop. *Humulus lupulus*: Level of genetic variability and segregation in F<sub>1</sub> progeny. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996a, **92**: 334-339.
40. Pillary M., Kenny S.T.: Structure and inheritance of ribosomal DNA variants in cultivated and wild hop. *Humulus lupulus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996b, **93**: 333-340.
41. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, **74**(12): 5463-5467.
42. Seefelder S., Seigner E.: Molecular markers for powdery mildew (*Sphaerotheca humuli*) resistance in hops. *IHGC Proceedings of the Scientific Commission, Dobrna-Žalec*, 2003, p. 8-11.
43. Semagn K., Bjornstad A., Ndjioudjop M.: An overview of molecular methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, 2006, **525**(25): 2540-2568.
44. Seroczyńska A., Kilian A.: Technologia DArT-nowe narzędzie do analizy zmienności genetycznej. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 2010, **555**: 373-388.

45. Š t a j n e r N., Jakš e J., Kozjak P., Javornik B.: The isolation and characterisation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Science*, 2004, **168**: 213-221.
46. S h i g e k i A., Tsuchiya Y., Takashio M., Tamaki T., Shinotsuka K.: Identification of hop cultivars by DNA marker analysis. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 2018, **56(3)**: 93-98.
47. S z t u b a - S o l i Ń s k a J.: Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. *Kosmos-Problemy Nauk Biologicznych*, 2005, **54(2-3)**: 227-239.
48. Š u š t a r - V o z l i č J., Javornik B.: Genetic relationship in cultivars of hop, *Humulus lupulus* L. determined by RAPD analysis. *Plan Breeding*, 1999, **118**: 175-181.
49. T o m a r R.S., Parakhia M., Patel S.V., Golakiya B.A.: Molecular markers and plant biotechnology. Hardcover, 2010, p. 273-332.
50. T s u c h i y a Y., Araki S., Takashio M., Tamaki T.: Identification of hop varieties using specific markers derived from RAPD markers. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, **84(2)**: 103-107.
51. V o s P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Homes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M.: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1995, **23(21)**: 4407-4414.
52. W a g n e r T.: The quantity and composition of bitter resins-chemotaxonomic characteristics of hop varieties. *Pharm. J. Slov.*, 1983, **34**: 77-83.
53. W a n g G., Fan C., Qiu Y., Zhao Y., Zhang J., Xin H., Li X.: The complete chloroplast genome of *Humulus lupulus* cv. Fubei01 (Rosales: *Cannabaceae*). *Mitochondrial DNA B Resour.*, 2021, **6(8)**: 2439-2441.
54. X i a L., Peng K., Yang S., Wentzl P., de Vincente M.C., Fregene M., Kilian A.: DArT for high-throughput genotyping of Cassava (*Manihot esculenta*) and its wild relatives. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, **110(6)**: 1092-1098.
55. Y a m a u c h i H.: Hop-variety identification using first-and second- generation sequencing. *Next Generation Sequencing*, 2016, **11**: 323-338.
56. Z a b e a u M., Vos P.: Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting. European Patent Application, publication number EP 0534858, 1993.

---

Adres do korespondencji:

*mgr Hanna Olszak-Przybyś*  
*Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin*  
*IUNG-PIB*  
*ul. Czartoryskich 8*  
*24-100 Puławy*  
*tel. 81 4786 930*  
*e-mail: Hanna.Olszak@iung.pulawy.pl*

---

AUTOR

Hanna Olszak-Przybyś

ORCID

0000-0003-3170-5188

**Marta Koziara-Ciupa**

*Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy  
w Puławach*

WPLYW SUSZENIA I PRZECHOWYWANIA  
NA WARTOŚĆ TECHNOLOGICZNĄ CHMIELU\*

**Słowa kluczowe:** chmiel, kwasy goryczkowe, olejki, polifenole, warunki przechowywania

**Wstęp**

Owocostany chmielu, tzw. szyszki chmielowe oraz wytwarzane z nich granulaty i ekstrakty są wykorzystywane w przemyśle piwowarskim. Zawarte w szyszkach specyficzne związki chemiczne, takie jak: żywice miękkie (alfa i beta kwasy), żywice twarde, olejki eteryczne i polifenole nadają piwu charakterystyczną goryczkę oraz chmielowy aromat. Ponadto stwierdzono, że związki te charakteryzują się wielokierunkową aktywnością biologiczną, np. przeciwbakteryjną, antyoksydacyjną czy przeciwzapalną (2, 13, 28), a ich wyjściowy skład ilościowy i jakościowy zależy od czynników klimatyczno-glebowych oraz stanowi cechę odmianową (26). Bezpośrednio po zbiorze szyszki chmielu są poddane działaniu warunków otoczenia, co może obniżać ich jakość. W czasie przechowywania dochodzi do utleniania cennych metabolitów, głównie alfa i beta kwasów należących do frakcji żywic miękkich i przekształcania ich m.in. w niepożądane frakcje żywic twardych. Szybkość tych przemian, określanych jako starzenie chmielu, zależy głównie od warunków zbioru, suszenia, temperatury przechowywania, dostępu powietrza, światła oraz odmiany chmielu (7, 8, 22, 35). Najbardziej odpowiednią metodą przeciwdziałania tworzeniu utlenionych form żywic miękkich jest jak najszybsze przeprowadzenie prawidłowego procesu suszenia, prasowania, pakowania oraz zapewnienie właściwych warunków magazynowania szyszek chmielu (8, 36). Dobrze przygotowany surowiec może zostać przetworzony na bardziej trwałe i mniej podatne na procesy utleniania granulaty chmielowe i ekstrakty powszechnie używane do produkcji piwa (10). Wyniki badań

\*Opracowanie wykonano w ramach zadania 6.3 pt. „Upowszechnianie wiedzy o wynikach uzyskiwanych w ramach realizacji zadania (hodowla i nasiennictwo chmielu i tytoniu)” z dotacji budżetowej przeznaczonej na realizację zadań MRiRW w 2022 r.



wskazują, że błędy popełnione bezpośrednio po zbiorze oraz na etapie suszenia i przechowywania szyszek chmielowych mogą przyczynić się do przyspieszenia procesów utleniania żywic miękkich, a tym samym pogorszenia jakości technologicznej i wartości ekonomicznej surowca.

### **Przygotowanie surowca chmielowego do przechowywania**

Szyszki chmielu zbierane są w fazie dojrzałości technologicznej. W tym czasie charakteryzują się najkorzystniejszym składem chemicznym oraz najlepszymi cechami fizycznymi, tj. dużą masą i sprężystością. Zawarta w szyszkach lupulina nabiera żółtej barwy i charakterystycznego chmielowego aromatu (36). Bezpośrednio po zbiorze szyszki chmielu wykazują wilgotność na poziomie około 75%, są więc wrażliwe na porażenie przez grzyby pleśniowe, a ekspozycja na światło prowadzi do pogorszenia walorów smakowych i zapachowych surowca (4). W celu ograniczenia tych niekorzystnych procesów bezpośrednio po zbiorze szyszki poddaje się suszeniu. Suszenie przeprowadza się najczęściej w komorowych suszarniach wielokondygnacyjnych, powietrzem ogrzany do temperatury 55–60°C, które przepływa przez poszczególne warstwy chmielu w sposób wymuszony (32). Całkowity czas suszenia wynosi około 8 godzin i zależy od odmiany chmielu oraz budowy szyszek. Szyszki większe, o zwartej budowie i grubszej osadce suszy się dłużej (36). Suszenie ma na celu ograniczenie reakcji utleniania, które zachodzą w szyszkach już na etapie zbioru na skutek wzrostu intensywności oddychania komórkowego. Ponadto składowanie niewysuszonych szyszek prowadzi do powstania sinobrazowego zabarwienia na ich powierzchni oraz utraty chmielowego aromatu; proces ten jest nieodwracalny i określany jako zaparzenie (35). Szyszki suszy się do wilgotności około 10% (32). Niestety, przy tak niskiej wilgotności stają się one kruche i łatwo ulegają uszkodzeniom, co prowadzi do obsypywania się gruczołów lupulinowych z listków szyszek. Jest to bardzo niekorzystne, bowiem w gruczołach lupulinowych gromadzi się większość cennych związków chemicznych (35). Należy zatem przed spakowaniem i sprasowaniem suszu w worki chmielarskie zwiększyć jego elastyczność poprzez nawilżanie do wilgotności 11–12% (35, 36). Susz chmielowy jest higroskopijny i łatwo wchłania wilgoć z powietrza, dlatego nawilżanie można przeprowadzić w sposób naturalny, np. przechowując wysuszony chmiel w dobrze przewietrzanych magazynach przez okres około 2 tygodni. Dużo szybciej można uzyskać pożądaną wilgotność suszu w specjalnych klimatyzatorach, gdzie surowiec jest przedmuchiwany powietrzem o temperaturze około 28°C i wilgotności 95% (36). Wysuszone i nawilżone szyszki chmielu umieszcza się warstwami w workach chmielarskich (cylindrycznych lub prostopadłościennych), przy czym każdą warstwę poddaje się procesowi prasowania, tak aby maksymalnie ograniczyć dostęp powietrza. Zapakowane w ten sposób szyszki chmielu należy magazynować w chłodnym, suchym miejscu, najlepiej bez dostępu światła. Zaleca się przechowywanie surowca w niskiej temperaturze – od 1 do 5°C, bowiem spowalnia

to procesy utleniania związków chemicznych, które niekorzystnie wpływają na jakość surowca i jego przydatność technologiczną (3, 16, 35, 36). Prawidłowo wysuszony i przechowywany chmiel zachowuje swoje właściwości przez okres kilku miesięcy (37). Z uwagi na to szyszki chmielowe powinny być przerobione na produkty, takie jak granulaty lub ekstrakty, tak szybko jak to możliwe. Wydłuża to trwałość chmielu i jego przydatność technologiczną nawet do 5 lat.

Na każdym etapie przygotowania surowca chmielowego do przechowywania może dochodzić do obniżenia parametrów jakościowych, szczególnie pod względem składu chemicznego (zawartości alfa i beta kwasów, olejków eterycznych, polifenoli), dlatego istotna jest weryfikacja wartości technologicznej szyszek. W tym celu konieczne jest przeprowadzenie analiz chemicznych, takich jak oznaczanie zawartości kwasów goryczkowych, żywic twardych czy indeksu zestarzenia (4, 12, 16, 37).

### **Wpływ warunków suszenia i przechowywania na zawartość i stabilność metabolitów wtórnych chmielu**

Błędne ustalenie terminu zbioru szyszek chmielu czy nieprawidłowy proces suszenia, pakowania i przechowywania wpływa na jakość surowca nieprzetworzonego, szczególnie na zawartość najważniejszych metabolitów wtórnych, takich jak: żywice chmielowe, olejki eteryczne, polifenole, które mają duże znaczenie dla przemysłu browarniczego. Dlatego też zmiany jakościowe i ilościowe metabolitów wtórnych, które zachodzą w szyszkach chmielu od momentu zbioru oraz ich wpływ na jakość surowca nieprzetworzonego, jak i produktów chmielowych stanowią przedmiot wielu badań.

### **Żywice chmielowe**

Ogólna zawartość żywic w szyszkach chmielu kształtuje się w granicach od 10 do 30% suchej masy w zależności od odmiany i warunków klimatyczno-glebowych uprawy (tab. 1). Żywice chmielowe dzielą się na dwie podstawowe frakcje, tj. rozpuszczalne w heksanie żywice miękkie oraz nierozpuszczalne żywice twarde (1). Zdecydowaną większość żywic chmielowych stanowią żywice miękkie, w skład których wchodzi najcenniejsze dla przemysłu piwowarskiego kwasy goryczkowe, tj. alfa i beta kwasy. Zawartość żywic twardych w szyszkach chmielu bezpośrednio po zbiorze waha się od 3 do 5% (tab. 1). Zarówno alfa kwasy (humulony), jak i beta kwasy (lupulony) są mieszaniną kilku homologów różniących się strukturą chemiczną łańcucha acylowego (40). Alfa kwasy dzielimy na: humulon (35–70% alfa kwasów), co-humulon (20–65%), ad-humulon (10–15%) oraz pre-humulon i post-humulon, natomiast do beta kwasów należą: lupulon (30–55% beta kwasów), co-lupulon (20–65%), ad-lupulon (10–15%), a także pre-lupulon i post-lupulon (39, 40).

Tabela 1

## Najważniejsze składniki żywic chmielowych

Związek lub grupa chemiczna	Zawartość (% s.m.)
Żyvice ogółem	10–30
Żyvice miękkie	9–28
Alfa kwasy	1,5–18
Beta kwasy	2,5–8
Żyvice twarde	1,5–5
Ksantohumul	0,3–1,5

Źródło: Biendl i Pinzl, 2008 (2); Almaguer i in., 2014 (1)

Podczas gotowania brzeczki piwnej alfa kwasy ulegają procesom izomeryzacji do rozpuszczalnych w wodzie i bardziej goryczkowych izo-alfa kwasów (1). W zależności od przebiegu procesu warzenia piwa izomeryzacji może ulegać około 50–70% alfa kwasów, a w końcowym produkcie pozostaje jedynie od 10 do 40% izo-alfa kwasów (39). Dzieje się tak na skutek utraty części izo-alfa kwasów w procesie odfiltrowywania piwa (38, 39). Z uwagi na to, że izo-alfa kwasy stanowią główne źródło goryczy w piwie są bardzo ważne dla procesu technologicznego, a browarnicy zwracają szczególną uwagę na ich zawartość w surowcu chmielowym (39). Chmiel jest podatny na działanie tlenu i degradację alfa i beta kwasów, dlatego zawartość tych związków zmienia się w trakcie przechowywania surowca. W 1950 r. po raz pierwszy zidentyfikowano humulinony będące głównymi produktami utleniania alfa kwasów. Okazało się, że wartość goryczkowa humulinonów stanowi jedynie 35% wartości goryczkowej izo-alfa kwasów. Dalsze przemiany humulinonów skutkują powstaniem kolejnych produktów utleniania, np. 4'-hydroxy-allohumulinonów (9). Liczne badania wskazują, że największy wpływ na stopień oraz tempo degradacji alfa kwasów podczas przechowywania szyszek chmielu ma temperatura oraz dostęp powietrza. Mikiška i Krofta (22) zaobserwowali, że w przypadku przechowywania suszu chmielowego bez dostępu powietrza i w temperaturze +2°C wyjściowa zawartość alfa kwasów w szyszkach czterech odmian chmielu utrzymywała się na względnie stałym poziomie przez okres 12 miesięcy. Natomiast w tym samym okresie podczas przechowywania surowca w temperaturze +20°C z dostępem powietrza strata alfa kwasów wynosiła od 64% do 88% (22). Canbaş i in. (4) badali zmiany zawartości kwasów goryczkowych w granulatach pięciu odmian chmielu. Granulat był przechowywany w temperaturze +3°C oraz w temperaturze pokojowej bez dostępu światła przez okres 6 miesięcy. Stwierdzono, że przechowywanie granulatu chmielowego jest korzystniejsze w niższych temperaturach, a spadek zawartości alfa kwasów zależy od odmiany i waha się od 6,9% do 19,4% w temperaturze +3°C oraz od 30,8% do 36,4% w temperaturze pokojowej (4). Kroupa i in. (20) stwierdzili, że już niewielki wzrost temperatury przechowywania wpływa na zmiany w zawartości alfa kwasów. Ubytek alfa kwasów w szyszkach chmielu przechowywanych

przez 6 miesięcy w temperaturze  $+9,4^{\circ}\text{C}$  był około 3 razy większy w porównaniu z chmielem przechowywanym w temperaturze  $+3^{\circ}\text{C}$  (20). Podobne badania obrazujące wpływ warunków przechowywania na stabilność alfa kwasów przeprowadzono w IUNG-PIB (37). Wykazano, że przechowywanie szyszek chmielu w temperaturach powyżej  $+20^{\circ}\text{C}$  skutkuje pogorszeniem ich walorów jakościowych. W okresie 12 miesięcy spadek zawartości kwasów goryczkowych wynosił od 20 do nawet 80% w stosunku do wartości początkowej. Stwierdzono również wpływ stopnia dojrzałości szyszek na stabilność metabolitów wtórnych podczas przechowywania. Szyszki chmielu zebrane w fazie dojrzałości technologicznej dłużej zachowywały dobrą jakość w zróżnicowanych warunkach przechowywania niż szyszki zebrane przed osiągnięciem dojrzałości technologicznej lub po jej zakończeniu. Wpływ stopnia dojrzałości szyszek na stabilność alfa kwasów był szczególnie widoczny podczas przechowywania w temperaturze  $+20^{\circ}\text{C}$  (37).

Beta kwasy należą do mniej gorzkiej frakcji kwasów goryczkowych. W przeciwieństwie do alfa kwasów nie ulegają reakcjom izomeryzacji, co wynika z różnic strukturalnych (brak trzeciorzędowej grupy alkoholowej w pierścieniu aromatycznym). Beta kwasy są w dużo większym stopniu podatne na procesy utleniania niż alfa kwasy oraz posiadają właściwości hydrofobowe, są więc słabiej rozpuszczalne w wodzie (19). Beta kwasy charakteryzują się również właściwościami przeciwbakteryjnymi, dzięki czemu wzmacniają stabilność biologiczną piwa, wydłużając jego trwałość oraz posiadają właściwości stabilizujące pianę (19). W latach pięćdziesiątych ubiegłego wieku zidentyfikowano najważniejsze produkty utleniania beta kwasów, tzw. hulupony. Hulupony, podobnie jak żywice miękkie, wykazują bardzo dobrą rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych charakteryzują się również gorzkim smakiem (1). Dalsze utlenianie huluponów prowadzi do powstania niegorzkiego kwasu hulupinowego (1). Stwierdzono, że przechowywanie chmielu wpływa na wzrost zawartości kwasu hulupinowego w szyszkach do około 0,05% (1). Mikyška i Krofta (22) stwierdzili, że przemiany beta kwasów podczas przechowywania zależą od temperatury i dostępu powietrza. Zaobserwowano, że w przypadku czterech badanych odmian chmielu przechowywanych w temperaturze  $+2^{\circ}\text{C}$  zawartość beta kwasów utrzymywała się na stałym poziomie przez okres 12 miesięcy, natomiast w tym samym okresie w temperaturze  $+20^{\circ}\text{C}$  z dostępem powietrza straty wynosiły około 80%. Taniguchi i in. (39) badali zmiany zawartości beta kwasów i produktów ich utleniania (huluponów) w granulatach chmielowych przechowywanych w różnych warunkach temperatury i stwierdzili, że po czterdziestu tygodniach przechowywania w temperaturze  $+20^{\circ}\text{C}$  zawartość beta kwasów zmniejszyła się o około 50%, w tym samym czasie zawartość huluponów wzrosła do 17%. W temperaturze  $+40^{\circ}\text{C}$  zawartość huluponów osiągnęła maksymalną wartość, tj. 30% beta kwasów już po czterech tygodniach, natomiast w warunkach ekstremalnych, czyli w  $+60^{\circ}\text{C}$  maksymalną zawartość huluponów obserwowano już po 72 godzinach i utrzymywała się ona do końca okresu przechowywania. Krofta i in. (18) stwierdzili, że potencjał goryczkowy produktów utleniania

beta kwasów kształtuje się na poziomie około 40% goryczki izo-alfa kwasów, co częściowo rekompensuje utratę goryczki związaną ze zmniejszaniem zawartości alfa kwasów podczas starzenia chmielu. Goryczka piwa uzyskana poprzez chmielenie przy użyciu produktów utleniania beta kwasów daje podobne odczucia sensoryczne, jak w przypadku chmielenia piwa z wykorzystaniem alfa kwasów. Zauważono również, że większość produktów utleniania beta kwasów jest rozpuszczalna w wodzie (18).

W wyniku reakcji utleniania zachodzących w czasie przechowywania chmielu frakcje należące do żywic miękkich ulegają przekształceniu do żywic twardych, co pogarsza wartość technologiczną chmielu (39). Składniki żywic twardych są nierozpuszczalne w wodzie oraz nadkrytycznym CO<sub>2</sub>, natomiast dobrze rozpuszczają się w niektórych rozpuszczalnikach organicznych, np. alkoholach czy eterze dietylowym. Początkowo sądzono, że żywice twarde powstają jedynie w czasie przechowywania surowca, jednak w 1956 r. Schild i Raum (33) odkryli, że żywice twarde obecne są również w świeżych szyszkach chmielu, co oznacza, że są one składnikami naturalnie wytwarzanymi w trakcie rozwoju szyszek. Niestety, ich zawartość w trakcie przechowywania surowca wzrasta w wyniku degradacji żywic miękkich (1).

### Olejki eteryczne

Olejki eteryczne chmielu to najważniejsza grupa lotnych związków zapachowych zawartych w szyszkach odpowiadających przede wszystkim za charakterystyczny chmielowy aromat surowca oraz piwa. Suszony chmiel zawiera, w zależności od odmiany, od 0,2 do 3,0% olejków eterycznych, które podobnie jak kwasy goryczkowe gromadzą się w gruczołach lupulinowych podczas dojrzewania szyszek (31). Skład chemiczny olejków eterycznych chmielu zależy od odmiany, warunków wzrostu, dojrzałości szyszek podczas zbioru oraz warunków suszenia i przechowywania. W skład olejków eterycznych chmielu wchodzi trzy podstawowe grupy związków: węglowodory, frakcja utleniona oraz frakcja zawierająca związki siarki (1, 2, 34) (tab. 2).

Tabela 2

Najważniejsze składniki olejków eterycznych chmielu

Związek lub grupa chemiczna	Zawartość (% s.m.)
Olejki eteryczne ogółem	0,2–3
Myrcen	0,1–1,2
Kariofilen	0,02–0,4
Humulen	0,04–1,1
Farnezen	<0,01–0,25
Linalol	<0,01–0,02

Źródło: Biendl i Pinzl, 2008 (2); Almaguer i in., 2014 (1)

Obecnie wiadomo, że olejki chmielowe są mieszaniną około 1000 związków, z których scharakteryzowano i zidentyfikowano 440 (1, 30). Proces suszenia chmielu ma istotny wpływ na zawartość olejków eterycznych, ponieważ lotne związki aromatyczne ulegają degradacji już w temperaturze 55–60°C (29, 30). Rybka i in. (30) przeprowadzili badania wpływu temperatury suszenia na zachowanie substancji lotnych w szyszkach 8 odmian chmielu. Wykazali, że straty olejków eterycznych podczas suszenia w temperaturze +40°C były mniejsze o około 33% w porównaniu z suszeniem w temperaturze +60°C (30). Zatem standardowy proces suszenia chmielu w temperaturze 55–60°C przez około 6–8 godzin może być niekorzystny dla niektórych substancji lotnych zawartych w szyszkach. Kilku autorów obserwowało, że straty całkowitej zawartości olejków eterycznych podczas suszenia wynoszą od 10 do 60% w zależności od warunków suszenia oraz odmiany (14, 24, 25). Szczególnie narażony na straty jest myrcen, który jest głównym składnikiem olejków eterycznych chmielu (14, 24, 25). Straty myrcenu podczas suszenia są większe w porównaniu z humulenem, kariofilemem czy linalolem i zależą od warunków suszenia i odmiany chmielu (14, 24, 25). Uzyskane wyniki wskazują na to, że suszenie chmielu w niższych temperaturach jest wprawdzie korzystniejsze dla olejków eterycznych, jednak wydłuża proces suszenia o kilka godzin (14, 24, 25, 30).

Howard i Slater (11) oraz Dieckmann i Palamand (5) zaobserwowali, że wraz z wydłużaniem okresu przechowywania chmielu skład olejków eterycznych stawał się bogatszy w związki utlenione kosztem frakcji węglowodorowej. Wzrost zawartości frakcji utlenionej prowadził do powstania związków nielotnych oraz zmniejszenia zawartości myrcenu, co skutkowało pogorszeniem jakości technologicznej surowca. Stwierdzono, że proces utleniania myrcenu przebiega etapowo w drodze reakcji cyklizacji, utleniania, dysproporcjonowania oraz polimeryzacji, w wyniku czego powstaje około 40 związków pochodnych.

### Polifenole

Całkowita zawartość polifenoli w szyszkach chmielu waha się od 2 do 6% (23). Skład polifenoli zależy od odmiany chmielu, techniki zbioru i stopnia zesterzenia szyszek chmielu (6, 23). Polifenole chmielowe to złożona grupa związków o zróżnicowanej budowie chemicznej, której najważniejsze składniki przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3

## Najważniejsze składniki polifenoli chmielu

Związek lub grupa chemiczna	Zawartość (% s.m.)
Polifenole chmielu ogółem	2–6
Flawonole	0,5
Kwercetyna	0,2
Kemferol	0,1
Flawan-3-ole	0,5
Katechiny	0,2
Fenolowe kwasy karboksylowe	0,05
Kwasy ferulowe	0,01
Prenyloflawonoidy	1,3
Ksantohumol	1,1
Desmetyloksantohumol	0,1
6-prenylnaringenina	0,03
8-prenylnaringenina	0,01
Rezweratol	<0,01

Źródło: Biendl i Pinzl, 2008 (2); Almaguer i in., 2014 (1)

Cechą charakterystyczną struktury chemicznej polifenoli jest pierścień aromatyczny z co najmniej dwiema grupami hydroksylowymi. Związki te występują głównie w listkach i osadce szyszek chmielu. Wyjątek stanowią niektóre prenyloflawonoidy, np. ksantohumol, 6-prenylnaringenina czy desmetyloksantohumol, które gromadzą się w gruczołach lupulinowych i mogą stanowić składniki żywic twardych. Ksantohumol wykazuje różnorodną aktywność biologiczną. Może hamować rozwój pleśni oraz wzrost bakterii Gram-dodatnich, wykazuje działanie przeciwwirusowe, a nawet przeciwnowotworowe. Niestety, podczas warzenia brzeczki piwnej tylko śladowe ilości ksantohumolu przechodzą do piwa, w związku z tym podjęto próby wzbogacenia ekstraktów chmielu w ksantohumol. Wykorzystując rozpuszczalność tego związku w rozpuszczalnikach organicznych, udało się wyodrębnić około 80–99% ksantohumolu zawartego w szyszkach, niestety proces ten jest kosztowny, a pozyskanie odpowiednio dużej ilości ksantohumolu trudne (15).

Rozwój chromatografii cieczowej pozwolił badaczom na identyfikację około 100 związków we frakcji polifenoli chmielu i dokonanie ich podziału na cztery podgrupy chemiczne ze względu na budowę jednostek fenolowych (tab. 3) (1). Stwierdzono, że odmiany aromatyczne chmielu charakteryzują się większą zawartością polifenoli niskocząsteczkowych niż odmiany goryczkowe, ponieważ podczas dojrzewania szyszek wzrost zawartości alfa kwasów odbywa się kosztem zawartości polifenoli (1). Polifenole wykazują właściwości przeciwutleniające i przeciwbakteryjne, chronią zatem piwo przed utlenianiem, przyczyniając się do zwiększenia stabilności smaku oraz wydłużają trwałość tego napoju (1). Jedynie około 20–30% polifenoli w brzeczce piwnej pochodzi z surowca chmielowego, pozostała pula to polifenole pochodzące

ze słodu (1). Badania wykazały, że zawartość polifenoli w trakcie przechowywania chmielu spada w granicach 30–40%, co wpływa na pogorszenie jakości chmielu (17, 22). Stopień degradacji zależy od odmiany oraz tego, czy chmiel jest przechowywany w formie szyszek czy granulatu. Granulat wykazywał większą stabilność pod względem zawartości polifenoli w porównaniu ze sprasowanymi szyszkami. Warunki przechowywania chmielu (temperatura, dostęp powietrza) nie miały istotnego wpływu na zmiany zawartości tych związków zarówno w szyszkach, jak i granulacie chmielowym.

### Sposoby przetwarzania szyszek chmielu

W celu zachowania walorów surowca i ograniczenia niekorzystnych przemian związków chemicznych zawartych w szyszkach chmiel jest przetwarzany na produkty chmielowe, takie jak: granulaty, ekstrakty oraz inne bardziej zaawansowane produkty chmielowe. Wykorzystanie produktów chmielowych do produkcji piwa stale rośnie. Obecnie jedynie nieco ponad 1% chmielu wykorzystywany jest w postaci wysuszonych i sprasowanych szyszek, natomiast prawie 99% surowca przetwarzanych jest na produkty chmielowe (tab. 4). W Polsce do obrotu handlowego dopuszczany jest surowiec spełniający minimalne wymagania jakościowe potwierdzone certyfikatem Inspekcji Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych (36). Wymagania te określają minimalną zawartość zanieczyszczeń grubych (do 6%) oraz drobnych (do 4%), a także wilgotność suszu (do 14%). Sprawdzana jest również zawartość nasion, która w chmielu niezaziarnionym nie powinna przekraczać 2%.

Tabela 4

Wykorzystanie produktów chmielowych w światowej produkcji piwa

Chmiel i produkty chmielowe	Udział w produkcji piwa (%)
Granulaty chmielowe	70,2
Ekstrakty chmielowe	28,7
Nieprzetworzone szyszki chmielu	1,1

Źródło: Hopsteiner Committed to the Brewer, Guidelines for Hop Buying, 2021 (10)

Świeżo zebrane i wysuszone szyszki chmielu mają niską wagę nasypową, co utrudnia ich szczelne zapakowanie bez dostępu powietrza i światła. Z uwagi na to są one narażone na działanie tych czynników i stosunkowo szybko mogą ulegać niekorzystnym procesom starzenia. Przetwarzanie na granulaty chmielowe nie tylko przedłuża trwałość surowca, ale również umożliwia lepsze wykorzystanie jego składników w procesie warzenia piwa. Pierwszym etapem przetwarzania suszu chmielowego na granulat jest mechaniczne rozdrobnienie i homogenizacja. Następnie uzyskany proszek poddaje się sprasowaniu w cylindryczne granulki o średnicy 6–8 mm (32). W ten sposób otrzymuje się granulat T-90, który charakteryzuje się składem chemicznym niemal identycznym jak chmiel wyjściowy. Surowiec można



również przetworzyć na granulaty skoncentrowany T-45 o standaryzowanej zawartości alfa kwasów. Wówczas szyszki chmielu przed zmieleniem mrozi się w temperaturze około  $-30^{\circ}\text{C}$ , co umożliwia oddzielenie lupuliny od listków szyszki. Po analizach zawartości podstawowych związków chemicznych lupulinę ponownie miesza się z listkami szyszek chmielu w określonych proporcjach w celu otrzymania granulatu skoncentrowanego o standaryzowanej zawartości alfa kwasów (2, 27). Granulat jest szczelnie pakowany w specjalne aluminiowe worki, w atmosferze gazu obojętnego (np. azotu), co chroni surowiec przed dostępem światła i utlenianiem cennych związków chemicznych. Przetworzenie szyszek chmielu w granulaty oraz jego odpowiednie zapakowanie pozwala na wydłużenie trwałości surowca oraz zmniejszenie kosztów magazynowania i transportu. Podobnie jak szyszki chmielu, granulaty powinny być przechowywane w suchym i chłodnym miejscu. W takich warunkach, w szczelnie zamkniętych workach zachowują trwałość przez trzy lata od daty produkcji (27).

Granulaty wykorzystuje się do produkcji ekstraktu chmielowego, który zawiera alfa i beta kwasy oraz olejki eteryczne. Najczęściej stosuje się ekstrakcję dwutlenkiem węgla w warunkach nadkrytycznych, w których  $\text{CO}_2$  przechodzi z fazy gazowej w płynną. Końcowy produkt ma konsystencję miodu i może częściowo zastąpić granulaty chmielowe, chociaż jego skład jest nieco inny, bowiem nie zawiera niektórych związków, np. ksantohumolu. Ekstrakty  $\text{CO}_2$  zapakowane w metalowe puszkę przeznaczone do kontaktu z żywnością w otoczeniu gazów obojętnych oraz przechowywane w niskiej temperaturze charakteryzują się długim terminem przydatności wynoszącym około 5 lat, a nawet dłużej (2).

Jak już wcześniej wspomniano, w czasie gotowania brzezki piwnej tylko część dodanych alfa kwasów ulega izomeryzacji do izo-alfa kwasów, które nadają piwu charakterystyczny gorzkawy smak. Wydajność procesu izomeryzacji zależy od przebiegu i długości warzenia piwa. W celu zwiększenia stopnia wykorzystania alfa kwasów wytwarzane są zizomeryzowane produkty chmielowe. Stosowanie zizomeryzowanych produktów chmielowych do produkcji piwa zwiększa stopień wykorzystania alfa kwasów do poziomu 85% (38). Znane i wykorzystywane są różne metody izomeryzacji alfa kwasów w chmielu i można je podzielić na następujące grupy: izomeryzację w alkalicznych roztworach wodnych, izomeryzację na sucho, izomeryzację termiczną oraz izomeryzację w ciekłym lub nadkrytycznym dwutlenku węgla (38). Najczęściej stosowanymi produktami izomeryzowanymi są tzw. izomery kotłowe dodawane na etapie warzenia brzezki; są to izomery otrzymywane w wyniku ekstrakcji ciekłym lub nadkrytycznym  $\text{CO}_2$  (38). Izomery te zawierają zamiast alfa kwasów odpowiednią ilość izo-alfa kwasów, pozostałe związki chmielu, takie jak beta kwasy czy olejki eteryczne pozostają na niezmiennym poziomie. Podobnie jak granulaty chmielowe, produkty zizomeryzowane powinny być przechowywane w suchym i chłodnym miejscu, w szczelnie zamkniętym worku z folii aluminiowej, w otoczeniu gazów obojętnych, maksymalnie przez okres 3 lat od daty produkcji (2, 27).

## Metody oceny jakości surowca i produktów chmielowych w trakcie przechowywania

Zarówno szyszki chmielu, jak i produkty chmielowe w wyniku długotrwałego przechowywania tracą cenne składniki chemiczne, co skutkuje obniżeniem wartości browarniczej surowca. Opracowano więc metody badawcze służące ocenie przydatności technologicznej magazynowanego surowca i produktów chmielowych. Najczęściej stosowanym miernikiem są zmiany zawartości alfa kwasów w trakcie przechowywania. O znacznym pogorszeniu jakości szyszek chmielowych w trakcie przechowywania świadczy ubytek zawartości alfa kwasów powyżej 20% w stosunku do wartości wyjściowej, badanej bezpośrednio po zbiorze (16). W przypadku produktów chmielowych (granulaty, ekstrakty) jako wskaźnik przydatności technologicznej stosuje się metodę Wöllmera lub indeks zesterzenia chmielu HSI (ang. *Hop Storage Index*). Metoda Wöllmera pozwala na określenie stopnia zesterzenia chmielu i jego produktów na podstawie zawartości żywic twardych. Zawartość żywic twardych na poziomie 15% w szyszkach oraz 17% w produktach chmielowych jest górną granicą dobrej jakości surowca i produktów; wyższe wartości wskazują na pogorszenie wartości technologicznej (12). Obecnie najczęściej stosowanym wskaźnikiem stopnia zesterzenia chmielu jest indeks HSI, który oblicza się na podstawie zawartości alfa i beta kwasów oraz utlenionych pochodnych tych związków oznaczonych metodą spektrofotometryczną. Wraz z postępem procesu utleniania kwasów goryczkowych w surowcu chmielowym wartość HSI wzrasta. Stopień zesterzenia produktów chmielowych i szyszek w zależności od wartości HSI i ubytku alfa kwasów przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5

Stopień zesterzenia surowca i produktów chmielowych w zależności od wartości indeksu HSI oraz ubytku alfa kwasów

Stopień zesterzenia	Spadek zawartości $\alpha$ -kwasów (%)	Wartość indeksu HSI
Surowiec świeży (bardzo dobry jakościowo)	0–10	<0,32
Surowiec wykazujący niewielki stopień zesterzenia	11–20	0,33–0,40
Surowiec wykazujący zaawansowane stadium starzenia	21–30	0,41–0,50
Surowiec stary	31–40	0,51–0,60
Surowiec przestarzały	>40	>0,61

Źródło: Koziara-Ciupa i Skomra, 2020 (16); Forster., 2001 (7)

Ogólnie przyjęto, że górną granicą przydatności technologicznej surowca i produktów chmielowych jest wartość HSI na poziomie 0,37 (7, 16). Niektórzy jednak uważają, że możliwe jest stosowanie do chmielenia piwa produktów o indeksie HSI

powyżej 0,50 pod warunkiem, że dodawane będą na początku gotowania brzeczki piwnej w celu usunięcia z parą wodną związków lotnych (21).

### Podsumowanie

Utlenianie cennych metabolitów wtórnych chmielu stanowi wciąż znaczący problem podczas zbioru, suszenia i przechowywania szyszek chmielu, bowiem produkty utleniania wpływają niekorzystnie na jakość surowca. Doniesienia literatury wskazują, że do najważniejszych czynników zapobiegających tym niekorzystnym procesom należą jak najszybsze suszenie zerwanych szyszek chmielowych oraz magazynowanie surowca w formie sprasowanej, w workach chmielarskich, w chłodnym magazynie, a także w miarę możliwości, jak najszybsze przetworzenie szyszek chmielu w bardziej trwałe produkty chmielowe. Właściwe postępowanie z surowcem chmielowym skutecznie ogranicza wzrost utlenionych form metabolitów wtórnych chmielu oraz umożliwia zachowanie przydatności technologicznej surowca nawet przez kilka lat.

### Literatura

1. Almaguer C., Schönberger Ch., Gastl M., Arendt E.K., Becker T.: *Humulus lupulus* – a story that begs to be told. A review. Journal of the Institute of Brewing, 2014, **120**: 289-314.
2. Biedl M., Pinzl C.: Hops and Health. Deutsches Hopfenmuseum, Wolnzach, Germany 2008.
3. Campbell S., Pearson B.: Packing and storage of hops (*Humulus lupulus*). UF/IFAS Extension. 2018, ENH **1297**.
4. Canbaş A., Erten H., Özşahin F.: The effects of storage temperature on the chemical composition of hop pellets. ELSEVIER. Process Biochemistry, 2001, **36**: 1053-1058.
5. Dieckmann R.H., Palamand S.R.: Autoxidation of some constituents of hops. I. The monoterpene hydrocarbon, myrcene. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1974, **22**: 498-503.
6. Forster A., Beck B., Schmidt R.: Investigations on hop polyphenols. Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Brussels. IRL Press: Oxford, 1995, p. 143-150.
7. Forster A.: The quality chain from hops to hop products. Proc. Techn. Comm. IHGC, Cantenbury, England 6–10 August, 2001, p. 1-20.
8. Forster A.: What happens to hop pellets during unexpected warm phases? Brauwelt International, 2002, **1(02)**: 43-46.
9. Hao J., Speers R.A., Heliang F., Deng Y., Dai Z.: A review of cyclic and oxidative bitter derivatives of alpha, iso-alpha and beta-hop acids. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2020, **78(2)**: 1-14.
10. Hopsteiner Committed to the Brewer, Guidelines for Hop Buying 2021. (<https://www.hopsteiner.com/news/type/guidelines/>)
11. Howard G.A., Slater C.A.: Evaluation of hops – VII. Composition of the essential oil of hops. Journal of the Institute of Brewing, 1957, **63**: 491-506.
12. Jamroz J., Mazurek A., Bolińbok M., Błaszczyk W.: Porównanie wartości wskaźników starzenia w ocenie wybranych produktów chmielowych. Acta Agrophysica, 2005, **6(2)**: 353-357.
13. Karabin M., Hudcova T., Jelinek L., Dostalek P.: Biologically active compounds from hops and prospects for their use. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2016, **15**: 542-567.

14. K i e n i n g e r H., Forster A.: Der Einfl uß der "Übertrocknung" von Hopfen auf die Aromazusammensetzung und den Geschmack des Bieres, Brauwiss. 1973, **26**: 214-217.
15. K o z i a r a M., Skomra U.: Aktywność biologiczna wybranych składników chmielu oraz ich potencjalny wpływ na organizm człowieka. Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, 2018, **62**: 10-14.
16. K o z i a r a-Ciupa M., Skomra U.: Zbiór i przechowywanie chmielu – ważne etapy produkcji wpływające na jakość surowca. Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, 2020, **64**: 31-34.
17. K r o f t a K., Mikyška A., Hašková D.: Changes in antioxidative properties of hops in the course of drying, milling, pelletization and storage. Kvasný Prumysl, 2007, **53**: 266-272.
18. K r o f t a K., Vrabcova S., Mikyska A., Jurkova M.: The effect of hop beta acids oxidation products on beer bitterness. Kvasny Prumysl, 2013, **59**: 306-312.
19. K r o f t a K., Mikyška A.: Hop beta acids: Properties, significance and utilization. Kvasný Prumysl, 2014, **60(4)**: 96-105.
20. K r o u p a F., Urban J., Ticha J.: Drop in the content of alpha bitter acids in the course of hop storage in conditioned and non – conditioned warehouses. Proc. Sci. Comm. IHGC, Dobrna – Zalec, 2003 Slovenia 24–27, June, p. 63-67.
21. M i c h a ł o w s k a D.: Hop Storage Index (HIS) – wskaźnik jakości chmielu i granulatów chmielowych. Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, 2017, **4**: 39-40.
22. M i k y š k a A., K r o f t a K.: Assessment of changes in hop resins and polyphenols during long-term storage. Journal of the Institute of Brewing, 2012, **118**: 269-279.
23. M i k y š k a A., K r o f t a K., Hašková D., Čulík J., Čejka P.: Impact of hop pellets storage on beer quality. Kvasný Prumysl, 2012, **58(5)**: 148-154.
24. N a r z i s s L., Forster A.: Gaschromatographische Untersuchungen zur Bestimmung der Aromastoffe in Hopfen und Hopfenverarbeitungen – produkten (2. Mitteilung), Brauwiss, 1971, **24**: 145-151.
25. N a r z i s s L., Forster A.: Gaschromatographische Untersuchungen zur Bestimmung der Aromastoffe in Hopfen und Hopfenverarbeitungen – produkten (5. Mitteilung), Brauwiss, 1972, **25**: 239-244.
26. P a v l o v i c V., Pavlovic M., Cerenak A., Kosir I.J., Ceh B., Rozman C., Turk J., Pazek K., Krofata K., Gregoric G.: Environment ant weather influence on quality and market value of hops. Plant Soil and Environment, 2012, **58**: 155-160.
27. Powiśle – Chmiel, granulaty chmielu ( [www.powisle.pl/grulaty-chmielu/56-grulaty-t-45](http://www.powisle.pl/grulaty-chmielu/56-grulaty-t-45))
28. P r z y b y ś M., Skomra U.: Hops as source of biologically active compounds. Polish Journal of Agronomy, 2020, **43**: 83-102.
29. R a u t S., von Gersdorff G.J.E., Münsterer J., Kammhuber K., Hensel O., Sturm B.: Influence of pre-drying storage time on essential oil components in dried hops (*Humulus lupulus* L.). Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, **101**: 2247-2225.
30. R y b k a A., Heřmánek P., Honzík I.: Effect of drying temperature in hop dryer on hop quality. RAE, 2021, **67(1)**: 1-7.
31. R y b a č e k V. (red.): Hop production. Developments in Crop Science. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, 1991, **16**.
32. S a m o Ń Z.: Studia nad metodami energooszczędnego suszenia chmielu. Monografie i Rozprawy Naukowe, Wyd. IUNG-PIB, 2004, **11**: 1-99.
33. S c h i l d E., Raum H.: Papierchromatographische Studien über die Bittersäuren und Harze des Hopfens, Brauwissenschaft, 1956, **9**: 150-160.
34. S c h ö n b e r g e r C., Kostelecky T.: 125<sup>th</sup> Anniversary review: The role of hops in brewing. Journal of the Institute of Brewing, 2011, **117(3)**: 259-267.
35. S k o m r a U.: Czynniki wpływające na jakość chmielu i jego produktów podczas przetwarzania i przechowywania. Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, 2015, **4(59)**: 37-38.

36. S k o m r a U.: Metodyka integrowanej ochrony chmielu. Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy 2015, s. 79-83.
  37. S k o m r a U., K o z i a r a - C i u p a M.: Stability of the hop bitter acids during long – term storage of cones with different maturity degree. Polish Journal of Agronomy, 2020, **40**: 16-24.
  38. S k o r e k U., H u b i c k i Z., R ó j E.: Intensyfikacja wykorzystania ekstarktu chmielowego do produkcji piwa. CHEMIK, 2011, **65(3)**: 160-163.
  39. T a n i g u c h i Y., M a t s u k u r a Y., O z a k i H., N i s h i m u r a K., S h i n d o K.: Identification and quantification of oxidation products derived from  $\alpha$ -Acids and  $\beta$ -Acids during storage of hops (*Humulus lupulus L.*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, **61**: 3121-3130.
  40. Z h a n g G., Z h a n g N., Y a n g A., H u a n g J., R e n X., X i a n M., Z o u H.: Hop bitter acids: resources, biosynthesis and applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, **105**: 4343-4356.
- 

Adres do korespondencji:

*mgr Marta Koziara-Ciupa*  
*Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin*  
*IUNG-PIB*  
*ul. Czartoryskich 8*  
*24-100 Puławy*  
*tel. 81 4786 934*  
*e-mail: Marta.Koziara@iung.pulawy.pl*

---

AUTOR

Marta Koziara-Ciupa

ORCID

0000-0001-5044-5241

Urszula Skomra

*Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy  
w Puławach*

## UWARUNKOWANIA I KIERUNKI ROZWOJU PRODUKCJI CHMIELU\*

**Słowa kluczowe:** chmiel, powierzchnia uprawy, wielkość produkcji, produkcja alfa kwasów, produkcja piwa, odmiany

### Wstęp

Chmiel jest cenną rośliną uprawną wykorzystywaną przede wszystkim przez przemysł piwowarski, a w dużo mniejszym stopniu do celów kosmetycznych i leczniczych. Uprawa tego gatunku koncentruje się w rejonach umiarkowanej strefy klimatycznej na półkulach północnej i południowej. Chmiel jest wieloletnim pnączem, dlatego uprawa prowadzona jest na wysokich konstrukcjach, które stanowią wsparcie dla jego wiotkich pędów. Gospodarstwa specjalizujące się w uprawie chmielu powinny być również wyposażone w suszarnię oraz szereg specjalistycznych maszyn i urządzeń, np. do cięcia karp, zbioru szyszek, nawilżania i pakowania surowca. Z uwagi na rozbudowaną i kosztowną infrastrukturę techniczną tradycja produkcji chmielu przekazywana jest często z pokolenia na pokolenie w rodzinnych gospodarstwach, w których stanowi ona główne źródło dochodów. Surowcem pozyskiwanym z roślin chmielu są żeńskie owocostany zwane powszechnie szyszkami. Przed wprowadzeniem do sprzedaży szyszki muszą być wysuszone i zapakowane w odpowiednie worki chmielowe oraz spełniać minimalne wymagania jakościowe potwierdzone certyfikatem. W Polsce certyfikację chmielu prowadzi Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych. Na świecie uprawianych jest około 300 odmian chmielu w dwóch typach użytkowych, tj. gorzyczkowym i aromatycznym. Głównym kryterium przyporządkowania odmiany do określonego typu użytkowego jest zawartość alfa kwasów oraz jakość aromatu. Odmiany gorzyczkowe charakteryzują się wysoką

\*Opracowanie wykonano w ramach zadania 6.3 pt. „Upowszechnianie wiedzy o wynikach uzyskiwanych w ramach realizacji zadania (hodowla i nasiennictwo chmielu i tytoniu)” z dotacji budżetowej przeznaczonej na realizację zadań MRiRW w 2022 r.

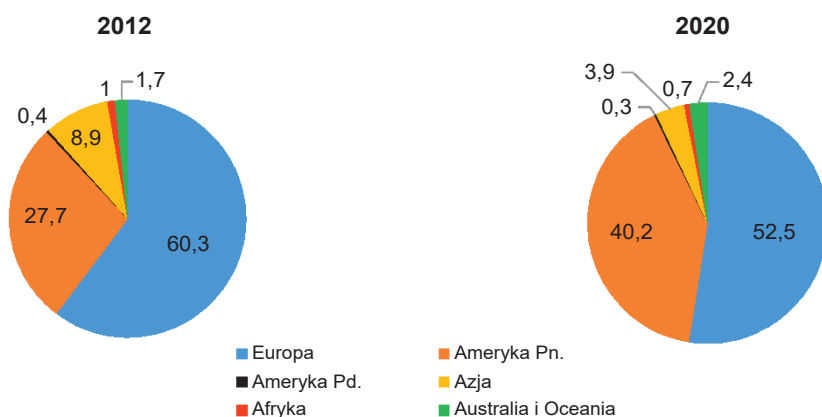
zawartością alfa kwasów w szyszkach, najczęściej na poziomie kilkunastu procent. W przypadku tych odmian jakość aromatu ma mniejsze znaczenie. Odmiany aromatyczne powinny cechować się przede wszystkim oryginalnym chmielowym zapachem, zawartość alfa kwasów jest tutaj mniej istotna i najczęściej nie przekracza kilku procent. Do chmielenia piwa stosuje się zazwyczaj odmiany obu typów w różnych proporcjach w zależności od gatunku piwa. Z uwagi na to, stabilizacja rynku chmielu opiera się nie tylko na zapewnieniu odpowiedniej ilości surowca, ale też na utrzymaniu właściwego balansu pomiędzy odmianami goryczkowymi i aromatycznymi.

Niniejsze opracowanie ma na celu przedstawienie sytuacji na rynku chmielu na świecie i w Polsce oraz zmian, jakie dokonały się w tym sektorze produkcji rolnej w ostatniej dekadzie.

## Produkcja chmielu na świecie

### Powierzchnia uprawy

Powierzchnia uprawy chmielu na świecie w 2021 r. osiągnęła blisko 63 500 ha (6). Gatunek ten jest uprawiany na wszystkich kontynentach z wyjątkiem Antarktydy, ale areal jest bardzo zróżnicowany. Światowym liderem pod względem powierzchni uprawy chmielu jest nadal Europa, chociaż jej udział zmniejszył się z 60,3% w 2012 r. do 52,5% w 2020 r. (rys. 1). Drugim bardzo prężnie rozwijającym się centrum uprawy chmielu jest Ameryka Północna, której udział w światowym areale chmielu w tym samym okresie wzrósł z 27,7% do 40,2%. W sumie na tych dwóch kontynentach w 2020 r. uprawiano ponad 57 800 ha chmielu, co stanowiło około 93% światowego arealu (1).



Rys. 1. Udział (%) poszczególnych kontynentów w światowym areale chmielu w latach 2012 i 2020

Źródło: opracowanie własne na podstawie BarthHaas Report, Hops 2012/2013 i 2020/2021 (1)

Mimo że w latach 2012–2020 całkowita powierzchnia uprawy chmielu na świecie wzrosła o 32,8%, to biorąc pod uwagę poszczególne kontynenty, sytuacja była dość zróżnicowana (tab. 1). Najbardziej dynamiczny wzrost areału chmielu odnotowano w Ameryce Północnej. W omawianym okresie przybyło tam 12 065 ha chmielu, co oznaczało wzrost o 92,9%. Na kontynencie europejskim dynamika wzrostu powierzchni uprawy chmielu w latach 2012–2020 była zdecydowanie mniejsza. Przybyło tam zaledwie 4 431 ha chmielu, co daje wzrost o 15,6%. Nowe nasadzenia odnotowano również w Australii i Nowej Zelandii, wprawdzie przybyło tam w sumie 711 ha chmielu, ale dla tego regionu stanowiło to bardzo duży wzrost powierzchni uprawy – o blisko 88%. W Ameryce Południowej i Afryce areał chmielu w omawianym okresie był dość stabilny z lekką tendencją spadkową odpowiednio o 8,6% oraz 7,2%. Największy spadek powierzchni uprawy chmielu, o ponad 42%, nastąpił w Azji. Główną przyczyną było zmniejszenie areału chmielu w Chinach z 3 989 ha w 2012 r. do 2 330 ha w 2020, a więc o 41,6% (1).

Tabela 1

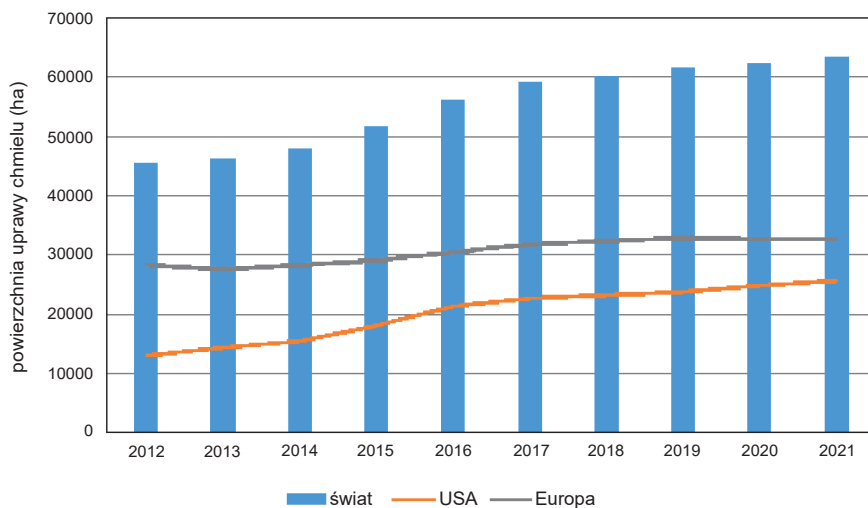
Powierzchnia uprawy chmielu na świecie w latach 2012 i 2020 w rozbiciu na kontynenty

Kontynent	Powierzchnia uprawy (ha)		Różnica między latami 2012–2020	
	2012 r.	2020 r.	ha	%
Europa	28330	32761	+4431	+15,6
Ameryka Pn.	12986	25051	+12065	+92,9
Ameryka Pd.	198	181	-17	-8,6
Azja	4187	2425	-1762	-42,1
Afryka	458	425	-33	-7,2
Australia i Oceania	812	1523	+711	+87,6
<b>Świat</b>	<b>46971</b>	<b>62366</b>	<b>+15395</b>	<b>+32,8</b>

Źródło: opracowanie własne na podstawie BarthHaas Report, Hops 2012/2013 i 2020/2021 (1)

Ostatnia dekada (2012–2021) to okres systematycznego wzrostu powierzchni uprawy chmielu na świecie (rys. 2). Przyrost powierzchni uprawy chmielu w porównaniu rok do roku obserwowano w całym analizowanym okresie, ale najbardziej dynamiczne wzrosty w granicach 5–9% rocznie odnotowano w latach 2015–2017. Było to spowodowane głównie bardzo szybkim wzrostem powierzchni uprawy chmielu w USA, gdzie w ciągu tych trzech lat przybyło ponad 4 400 ha plantacji. Od 2018 r. dynamika wzrostu powierzchni uprawy chmielu na świecie była mniejsza i utrzymywała się na poziomie 1–2% rocznie. Mimo że w skali świata trend wzrostowy utrzymywał się przez całą rozpatrywaną dekadę, to w przypadku Europy w latach 2020 i 2021 odnotowano nawet niewielkie zmniejszenie areału uprawy chmielu, odpowiednio o 123 i 152 ha rocznie (6).

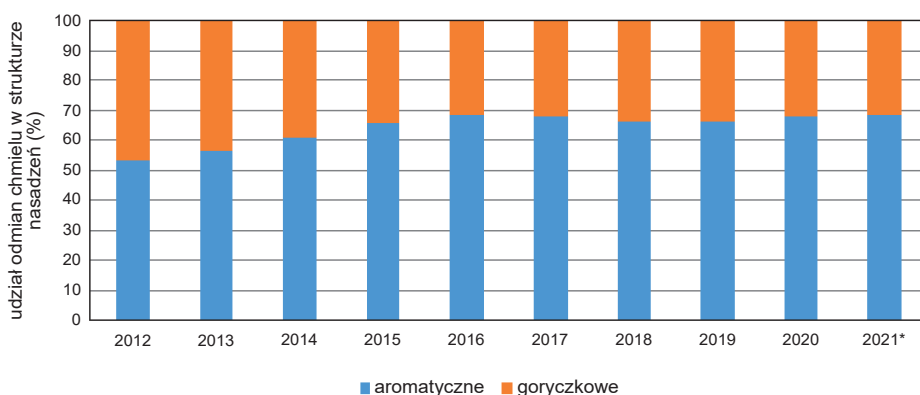




Rys. 2. Dynamika zmian powierzchni uprawy chmielu na świecie oraz w Europie i USA w latach 2012–2021

Źródło: opracowanie własne na podstawie Hopsteiner Committed to the Brewer, Guidelines for Hop Buying 2012–2021 (6)

W ostatniej dekadzie zaszły również duże zmiany w strukturze odmianowej nasadzeń chmielu na świecie. Zdecydowanie, bo aż o 75,6%, zwiększył się areal odmian aromatycznych, z 23 955 ha w 2012 r. do 42 071 ha w 2021 r. (7). W tym samym okresie powierzchnia uprawy odmian goryczkowych zmniejszyła się o 8,7%, a udział tych odmian w światowym areale chmielu spadł z 46,9% do 31,5% (rys. 3).



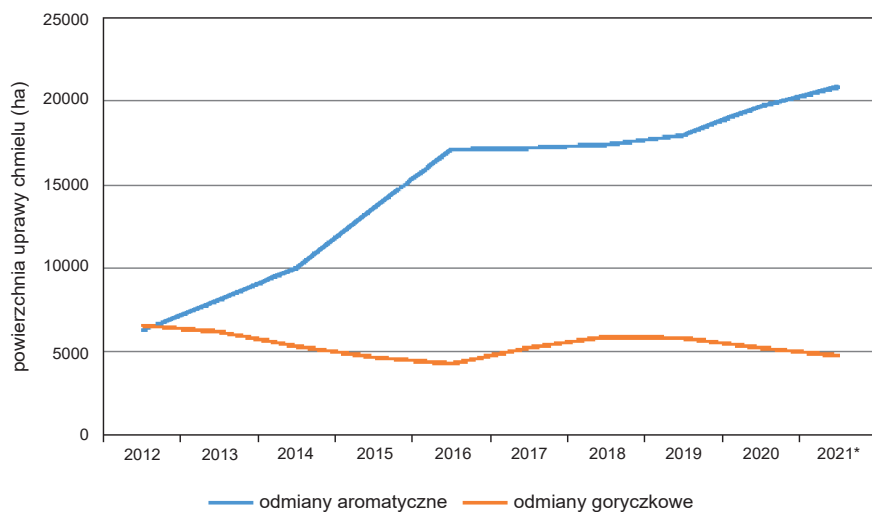
\* dane szacunkowe

Rys. 3. Udział odmian aromatycznych i goryczkowych chmielu w strukturze nasadzeń na świecie w latach 2012–2021

Źródło: opracowanie własne na podstawie: International Hop Growers' Convention Economic Commission Summary Reports 2012–2021 (7)

Największy wpływ na światowy rynek chmielu w ostatniej dekadzie miały przemiany, które dokonały się w USA. W latach 2012–2021 areal chmielu w tym kraju podwoił się, a strukturę nasadzeń zdominowały odmiany aromatyczne (5). Siłą napędową tych zmian był dynamiczny rozwój małych browarów rzemieślniczych. W latach 2012–2021 liczba takich browarów w USA wzrosła blisko czterokrotnie, z 2475 w 2012 r. do 9118 w 2021 r. (2). Sukces rynkowy browarów rzemieślniczych opiera się na bogatej ofercie piw wysokiej jakości o wyrafinowanym smaku i niepowtarzalnym charakterze, produkowanych z wykorzystaniem dużych dawek chmielu, głównie odmian aromatycznych. Rozwój sektora browarów rzemieślniczych zwiększył znacząco zapotrzebowanie na odmiany typu aromatycznego zarówno te klasyczne o szlachetnym chmielowym aromacie, jak i odmiany smakowe (ang. *flavor hops*) charakteryzujące się specyficznym profilem aromatycznym wzbogaconym o nuty nietypowe dla chmielu, np. kwiatowe czy owocowe. Odpowiadając na zapotrzebowanie rynku, Amerykanie intensywnie zwiększali powierzchnię uprawy odmian aromatycznych (rys. 4). W latach 2012–2016 ich areal wzrastał o 25–30% rocznie. Po roku 2016 intensywność nasadzeń odmian aromatycznych zmniejszyła się do kilku procent rocznie, ale biorąc pod uwagę całą dekadę (2012–2021), powierzchnia uprawy odmian aromatycznych w USA wzrosła o 14 507 ha (7). Wpłynęło to w sposób znaczący na strukturę odmianową nasadzeń. O ile w 2012 r. w uprawie chmielu w USA przeważały odmiany goryczkowe, a aromatyczne zajmowały tylko 48,8% areалу, to w 2021 r. udział odmian aromatycznych wzrósł do 81,3% (7). USA są obecnie największym producentem chmielu aromatycznego. Wielkość produkcji w 2021 r. oszacowano na 38,7 tys. ton, co stanowiło około 50% surowca typu aromatycznego wyprodukowanego na świecie (7).

Mimo bardzo dużego wzrostu powierzchni uprawy chmielu w USA, nadal większość, tj. około 52%, światowego areálu chmielu skoncentrowana jest w Europie, gdzie dominującą rolę odgrywają Niemcy (tab. 2). W latach 2012–2020 przybyło tam 3 578 ha chmielu (+20,9%), co stanowi areal dwukrotnie większy, niż np. powierzchnia uprawy chmielu w Polsce w 2020 r. Skutkiem tak znacznego wzrostu było umocnienie Niemiec na pozycji lidera w uprawie chmielu w Europie i zwiększenie udziału tego kraju w europejskim areale chmielu z 60,5% w roku 2012 do 63,2% w 2020 r. (1). W omawianym okresie (2012–2020) znaczący wzrost powierzchni uprawy chmielu odnotowano również w Republice Czeskiej (600 ha), a także w Słowenii i Polsce (odpowiednio 320 ha oraz 248 ha) (tab. 2). Niestety w tym samym czasie w Wielkiej Brytanii powierzchnia uprawy chmielu zmniejszyła się o 186 ha, co oznaczało spadek o 17,6%. Bardzo drastyczne ograniczenie uprawy chmielu nastąpiło również w Słowacji (spadek z 214 ha do zaledwie 38 ha) i Bułgarii (spadek ze 150 ha do 33 ha), a także w Turcji (spadek z 348 ha do 202 ha) (1).



\* dane szacunkowe

Rys. 4. Dynamika wzrostu powierzchni uprawy odmian aromatycznych i goryczkowych chmielu w USA w latach 2012–2021

Źródło: opracowanie własne na podstawie International Hop Growers' Convention Economic Commission Summary Reports 2012–2021 (7)

Tabela 2

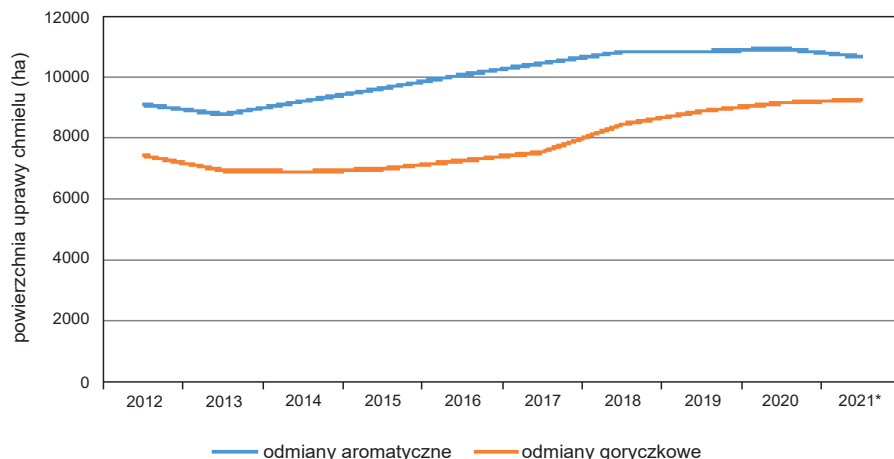
Dynamika zmian powierzchni uprawy chmielu w Europie w latach 2012–2020

Kraj	Powierzchnia uprawy (ha)		Różnica między latami 2012–2020	
	2012 r.	2020 r.	ha	%
Niemcy	17128	20706	3578	+20,9
Rep. Czeska	4366	4966	600	+13,7
Polska	1510	1758	248	+16,4
Słowenia	1160	1480	320	+27,6
Wielka Bryt.	1054	868	-186	-17,6
Hiszpania	541	562	21	+3,9
Francja	439	500	61	+13,9
Pozostałe kraje	2132	1921	-211	-9,9
<b>Razem Europa</b>	<b>28330</b>	<b>32761</b>	<b>4431</b>	<b>+15,6</b>

Źródło: opracowanie własne na podstawie BarthHaas Report, Hops 2012/2013 i 2020/2021 (1)

Główny wpływ na europejski sektor uprawy chmielu ma sytuacja u największego producenta w Europie, czyli w Niemczech. Mimo znaczącego wzrostu powierzchni uprawy w tym kraju nie obserwowano większych zmian w strukturze odmianowej

nasadzeń. Udział odmian aromatycznych i goryczkowych utrzymywał się w ostatnim dziesięcioleciu na zbliżonym poziomie, tj. około 56% areалу zajmowały odmiany aromatyczne, a 44% goryczkowe (rys. 5).



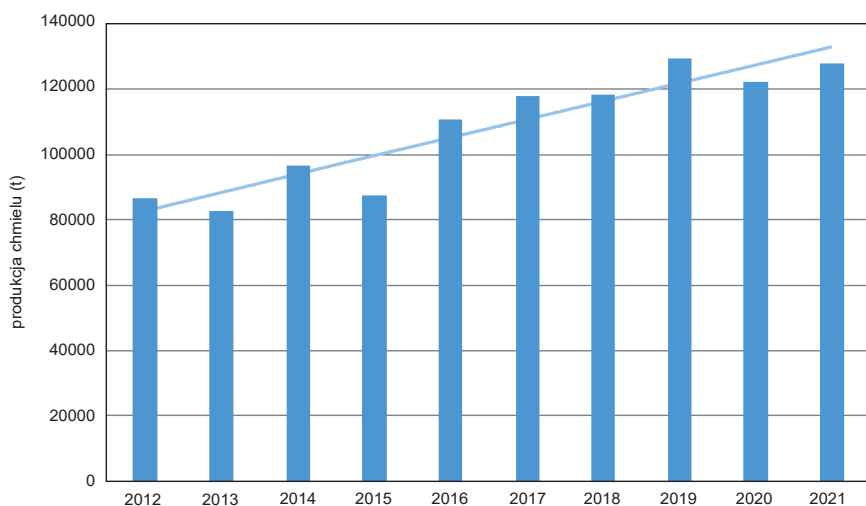
\* dane szacunkowe

Rys. 5. Dynamika nasadzeń odmian aromatycznych i goryczkowych chmielu w Niemczech w latach 2012–2021

Źródło: opracowanie własne na podstawie International Hop Growers' Convention Economic Commission Summary Reports 2012–2021 (7)

## Produkcja szyszek

Wielkość produkcji szyszek chmielowych jest wypadkową powierzchni uprawy oraz plonu. Z uwagi na to, że plon chmielu w dużym stopniu zależy od warunków pogodowych w sezonie wegetacyjnym, podlega on dość znacznym wahaniom w poszczególnych latach. Średnie plony chmielu na świecie w latach 2012–2021 wahały się od  $1\,692\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  w 2015 r. do  $2\,099\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  w 2019 r., przy średniej dla całej dekady na poziomie  $1\,937\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  (6). W całym rozpatrywanym okresie widoczny jest wyraźny trend wzrostowy światowej produkcji chmielu (rys. 6). Według danych firmy Hopsteiner (6) w latach 2012–2021 produkcja chmielu na świecie zwiększyła się o 47,1%. Wynika to w głównej mierze ze wzrostu powierzchni uprawy, ale również z postępu biologicznego wyrażającego się poprawą potencjału plonowania nowych odmian chmielu wprowadzanych do uprawy.



\* dane szacunkowe

Rys. 6. Wielkość produkcji chmielu na świecie w latach 2012–2021

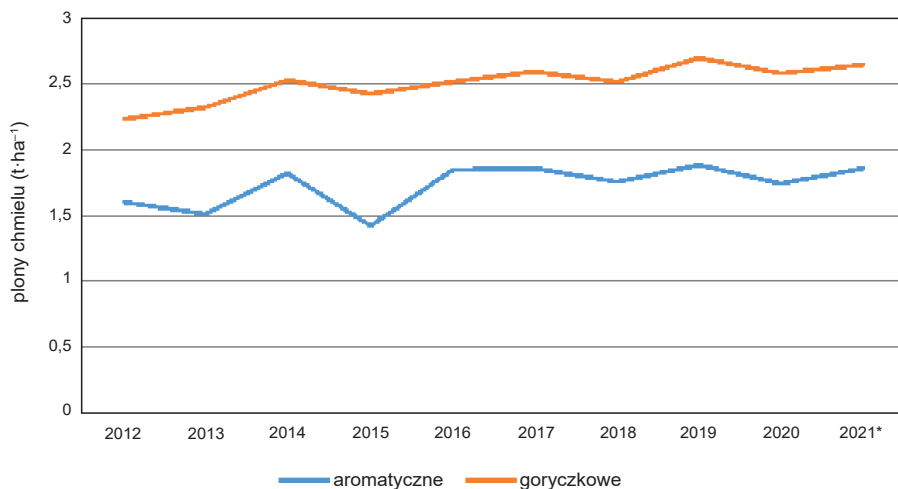
Źródło: opracowanie własne na podstawie Hopsteiner Committed to the Brewer, Guidelines for Hop Buying 2012–2021 (6)

W latach 2012–2021 średni plon odmian aromatycznych kształtował się na poziomie  $1\,734\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ , natomiast goryczkowych był wyższy o 44,6% i wynosił  $2\,508\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  (7). W analizowanym okresie obserwowano systematyczny wzrost plonowania zarówno w przypadku odmian aromatycznych, jak i goryczkowych (rys. 7). W roku 2012 średni plon odmian aromatycznych chmielu na świecie wynosił  $1\,602\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ , podczas gdy w roku 2021 był o blisko 16% większy, tj. osiągnął poziom  $1\,856\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ . W przypadku odmian goryczkowych przeciętne plony wzrosły z  $2\,234\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  do  $2\,642\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ , tj. o ponad 18%.

Wzrost udziału odmian aromatycznych chmielu w strukturze nasadzeń spowodował również zwiększenie roli tego typu odmian w produkcji surowca. Według danych Międzynarodowej Organizacji Producentów Chmielu (IHGC) w 2012 r. chmiel aromatyczny stanowił tylko 44,8% światowej produkcji, podczas gdy w roku 2021 było to już 60,5% (7).

Z uwagi na to, że ponad 90% światowej produkcji chmielu skoncentrowane jest w Europie i Ameryce Północnej, zmiany, które dokonują się na tych dwóch kontynentach w największym stopniu rzutują na cały światowy rynek chmielu. W ostatniej dekadzie (2012–2021) liderem światowej produkcji chmielu była Europa. Pomimo że produkcja chmielu na tym kontynencie wzrosła w omawianym okresie o ponad 18 tys. ton, to jego udział w światowym rynku chmielu zmniejszył się z 55,3% do 51,7% (tab. 3). Wynikało to głównie ze wzmocnienia pozycji Ameryki Północnej, której udział w światowej produkcji chmielu wzrósł z 32,1% w roku 2012 do 40,2%

w 2021 r. Kontynentami, które w ostatniej dekadzie straciły na znaczeniu, jeśli chodzi o produkcję chmielu, są: Azja, której udział w światowym rynku chmielu zmniejszył się z 9,1% w 2012 r. do 5,0% w 2021, a także Afryka (tab. 3).



\*dane szacunkowe

Rys. 7. Średnie plony aromatycznych i goryczkowych odmian chmielu na świecie w latach 2012–2021

Źródło: opracowanie własne na podstawie International Hop Growers' Convention Economic Commission Summary Reports 2012–2021 (7)

Tabela 3

Udział poszczególnych kontynentów w produkcji chmielu na świecie w 2012 r. i 2021 r.

Kontynent	2012		2021*	
	produkcja chmielu (t)	udział w produkcji światowej (%)	produkcja chmielu (t)	udział w produkcji światowej (%)
Europa	47 912	55,3	65 914	51,7
Ameryka Pn.	27 782	32,1	51 302	40,2
Ameryka Pd.	281	0,3	268	0,2
Azja	7 893	9,1	6 302	5,0
Afryka	1 003	1,2	739	0,6
Australia i Oceania	1 786	2,0	2 954	2,3
<b>Świat</b>	<b>86 657</b>	<b>100</b>	<b>127 479</b>	<b>100</b>

\*dane szacunkowe

Źródło: opracowanie własne na podstawie Guidelines for Hop Buying 2012–2021. Hopsteiner Committed to the Brewer (6)

Chmiel jest produkowany w kilkunastu europejskich krajach, z wyjątkiem tych wysuniętych najdalej na północ i południe kontynentu. Jednak najdogodniejsze warunki do uprawy występują w środkowej części Europy i tam zlokalizowana jest większość produkcji. Największym producentem chmielu w Europie są Niemcy, których udział w europejskiej produkcji chmielu utrzymuje się na poziomie około 72% (tab. 4). W roku 2021 produkcja chmielu w Niemczech była o 37,6% wyższa w porównaniu z rokiem 2012. Wzrost ten wynikał zarówno ze wzrostu powierzchni uprawy o ponad 20%, jak również z wprowadzenia do uprawy i zwiększenia udziału w strukturze nasadzeń nowych, wysokoplonujących odmian, takich jak Herkules. Według danych firmy BarthHaas (1) w 2012 r. odmiana Herkules w Niemczech była uprawiana na powierzchni 2 642 ha, co stanowiło 15,4% całego arealu chmielu w tym kraju, natomiast w 2020 r. powierzchnia uprawy tej odmiany wzrosła do 6 717 ha, a jej udział w areale zwiększył się do 32,4%.

Do krajów, które w ostatniej dekadzie zwiększyły swój udział w produkcji chmielu w Europie należą również Republika Czeska oraz Polska (tab. 4). Spośród większych producentów chmielu w Europie najbardziej na znaczeniu straciła Wielka Brytania, której udział w europejskiej produkcji spadł z 3% w 2012 r. do 1,3% w 2021 r.

Tabela 4

Udział poszczególnych krajów w produkcji chmielu w Europie w latach 2012 i 2021

Kraj	2012		2021*	
	produkcja chmielu (t)	udział w produkcji europejskiej (%)	produkcja chmielu (t)	udział w produkcji europejskiej (%)
Niemcy	34475	72,0	47435	72,0
Rep. Czeska	4338	9,0	8481	12,9
Polska	1818	3,8	3250	4,9
Słowenia	1560	3,3	1718	2,6
Wielka Bryt.	1459	3,0	835	1,3
Hiszpania	1028	2,1	940	1,4
Francja	752	1,6	1025	1,5
Pozostałe kraje	2482	5,2	2230	3,4
<b>Razem Europa</b>	<b>47912</b>	<b>100</b>	<b>65914</b>	<b>100</b>

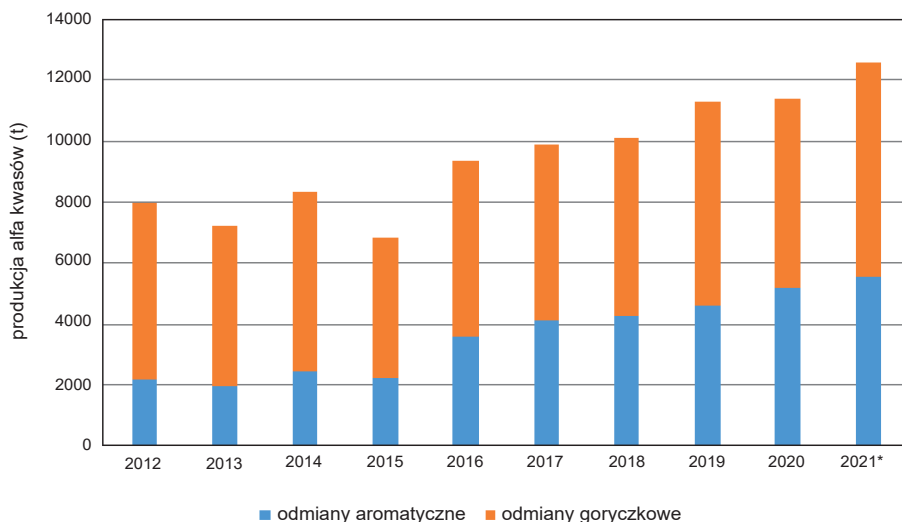
\*dane szacunkowe

Źródło: opracowanie własne na podstawie Guidelines for Hop Buying 2012–2021. Hopsteiner Committed to the Brewer (6)

## Produkcja alfa kwasów

Głównym odbiorcą surowca chmielowego jest przemysł piwowarski, który wykorzystuje na swoje potrzeby ponad 90% światowej produkcji. Zapotrzebowanie na

chmiel szacowane jest na podstawie wielkości produkcji piwa oraz produkcji alfa kwasów, które z punktu widzenia przemysłu piwowarskiego są najważniejszymi metabolitami występującymi w szyszkach chmielowych. Produkcja alfa kwasów jest wypadkową produkcji szyszek oraz zawartości tych związków w surowcu. Zawartość alfa kwasów w szyszkach poszczególnych odmian chmielu jest uwarunkowana genetycznie, ale w dużym stopniu jest też modyfikowana przez warunki uprawy (8, 9, 11).



\* dane szacunkowe

Rys. 8. Produkcja alfa kwasów na świecie w latach 2012–2021 z uwzględnieniem aromatycznych i goryczkowych odmian chmielu

Źródło: opracowanie własne na podstawie Guidelines for Hop Buying 2012–2021. Hopsteiner Committed to the Brewer (6)

W ostatniej dekadzie obserwowano wyraźny trend wzrostowy produkcji alfa kwasów w skali świata, szczególnie wyraźnie zaznaczył się on w latach 2016–2021 (rys. 8). O ile w latach 2012–2015 średnia produkcja alfa kwasów na świecie kształtowała się na poziomie 7 588 ton, to w kolejnych latach (2016–2021) wzrosła średnio do 10 788 ton, a więc o ponad 40% (6).

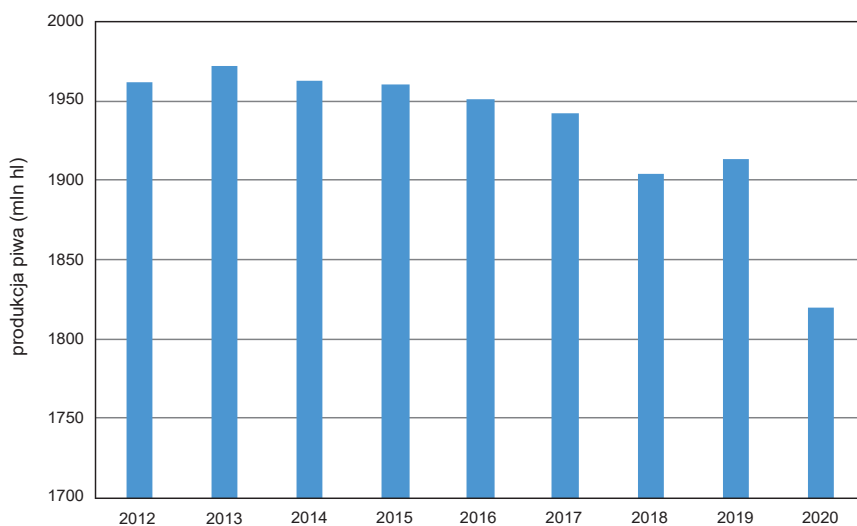
W analizowanym okresie zmienił się również udział odmian aromatycznych i goryczkowych w produkcji alfa kwasów. W roku 2012 blisko 73% alfa kwasów wyprodukowanych na świecie pochodziło z odmian goryczkowych, a jedynie nieco ponad 27% z aromatycznych (rys. 8). Wprawdzie areał obu typów odmian był w tym czasie zbliżony, ale odmiany goryczkowe chmielu charakteryzują się zdecydowanie wyższą zawartością alfa kwasów w porównaniu z aromatycznymi, co było przyczyną obserwowanych dysproporcji w produkcji alfa kwasów. Jednak zwiększenie areału



odmian aromatycznych chmielu, które miało miejsce w ostatniej dekadzie, przyczyniło się również do wzrostu udziału tych odmian w produkcji alfa kwasów. W roku 2021 udział odmian aromatycznych w produkcji alfa kwasów wzrósł do 44,3% (6).

Popyt na alfa kwasy na świecie jest kształtowany przez przemysł piwowarski i zależy w dużej mierze od wielkości produkcji oraz dawki alfa kwasów stosowanej do chmielenia piwa.

Produkcja piwa na świecie po bardzo dynamicznych wzrostach, które miały miejsce w pierwszej dekadzie XXI wieku (10), ustabilizowała się na poziomie około 1 960 mln hektolitrów rocznie, a od roku 2016 zmniejszała się systematycznie (rys. 9). Początkowo były to niewielkie spadki w granicach 10 mln hl rocznie, co w skali całego świata stanowiło około 0,5%. W 2018 r. odnotowano spadek o blisko 40 mln hl, spowodowany przede wszystkim zmniejszeniem produkcji w Chinach i USA, które są największymi producentami piwa na świecie. Niestety pandemia COVID-19 pogłębiła trend spadkowy. W 2020 r. odnotowano spadek produkcji piwa o ponad 90 mln hl, a więc o blisko 5% (1). Największą recesję w sektorze piwowarskim zaobserwowano w Azji (-10%), Afryce (-6,5%) oraz w Europie (-5,5%) (1).

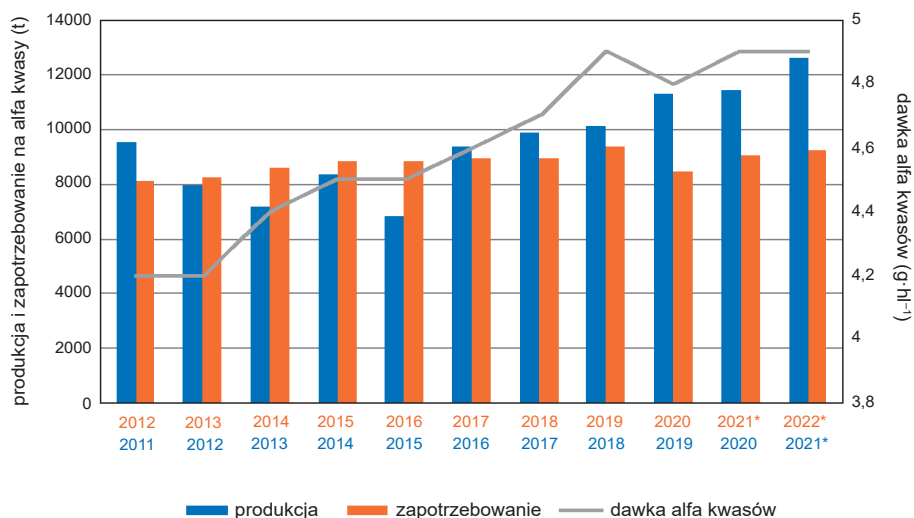


Rys. 9. Produkcja piwa na świecie w latach 2012–2022

Źródło: opracowanie własne na podstawie Barth-Haas Report. Hops 2013/2014–2020/2021 (1)

Dekoniunktura na rynku piwa na świecie nie wpłynęła znacząco na zmniejszenie zapotrzebowania na alfa kwasy. Wprost przeciwnie, w ostatniej dekadzie popyt generowany przez przemysł piwowarski wykazywał nawet lekki trend wzrostowy (rys. 10). Przyczyną był stały i bardzo dynamiczny wzrost dawki alfa kwasów stosowanej do chmielenia piwa. Według danych Hopsteiner (6) dawka alfa kwasów

w piwie w 2012 r. kształtowała się na poziomie  $4,2 \text{ g} \cdot \text{hl}^{-1}$ , podczas gdy w roku 2021 było to już  $4,9 \text{ g} \cdot \text{hl}^{-1}$  (rys. 10). Inne źródła (1) wskazują na jeszcze większy wzrost dawki alfa kwasów, w granicach  $4,5\text{--}5,9 \text{ g} \cdot \text{hl}^{-1}$ . Mimo to zapotrzebowanie na alfa kwasy rośnie wolniej niż ich produkcja. Od 2016 r. podaż alfa kwasów na światowym rynku przewyższa popyt i sytuacja ta pogłębia się z każdym rokiem. O ile w 2016 r. nadprodukcja wynosiła zaledwie 426 t, to w roku 2021 było to już 3 325 t (rys. 10). Jest to ilość, która niemal dziesięciokrotnie przekracza średnią roczną produkcję alfa kwasów w Polsce. Szacuje się, że obecne zapasy chmielu na świecie są wystarczające do zabezpieczenia produkcji piwa przez 1,5 roku (6). Konsekwencją rosnących zapasów jest zmniejszenie popytu zarówno na surowiec, jak i produkty chmielowe. Odbija się to na cenach chmielu, przede wszystkim tego sprzedawanego na wolnym rynku poza długoterminowymi kontraktami. Według danych Komisji Europejskiej (4) ceny chmielu wolnorynkowego w Europie w 2020 r. spadły aż o 33% w stosunku do roku 2019. Powrót do równowagi będzie się prawdopodobnie wiązał ze zmniejszeniem światowego arealu chmielu. Na razie, w skali świata, powierzchnia uprawy chmielu systematycznie rośnie, chociaż dynamika wzrostu jest obecnie mniejsza niż na początku omawianej dekady. Są jednak rejony, jak na przykład Azja czy Europa, gdzie w ostatnich latach obserwuje się zmniejszanie powierzchni uprawy chmielu. Skala tego zjawiska jest na razie niewielka, co wynika głównie z faktu, że sprzedaż chmielu jest objęta w dużej mierze długoterminowymi kontraktami, które zabezpieczają plantatorów przed gwałtownymi wahaniami koniunktury.



\*dane szacunkowe

Rys. 10. Produkcja oraz zapotrzebowanie na alfa kwasy na świecie

Źródło: opracowanie własne na podstawie Guidelines for Hop Buying 2012–2021. Hopsteiner Committed to the Brewer (6)

## Produkcja chmielu w Polsce

Polska jest jednym z większych producentów chmielu na świecie, ale ze względu na specyfikę tego sektora, zdominowanego przez USA i Niemcy, udział naszego kraju w światowym rynku chmielu jest niewielki (tab. 5). Według danych Międzynarodowej Organizacji Producentów Chmielu (7) w ostatniej dekadzie udział Polski w światowym areale chmielu wahał się od 3,28% w 2012 r. do 2,68% w 2017 r., przy średniej dla całego rozpatrywanego okresu na poziomie 2,89%. Udział Polski w światowej produkcji chmielu i w produkcji alfa kwasów był jeszcze mniejszy i wynosił odpowiednio: 2,63% i 2,25%.

Tabela 5

Udział Polski w światowym rynku chmielu w latach 2012–2021

	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021*	Średnio
Udział Polski w światowym areale (%)	3,28	3,07	3,00	2,86	2,70	2,68	2,76	2,87	2,83	2,81	<b>2,89</b>
Udział Polski w światowej produkcji chmielu (%)	2,12	2,94	2,17	2,60	2,80	2,52	2,70	2,89	2,96	2,62	<b>2,63</b>
Udział Polski w światowej produkcji alfa kwasów (%)	1,88	2,60	1,76	2,28	2,47	2,14	2,41	2,39	2,56	2,03	<b>2,25</b>

\* dane szacunkowe

Źródło: opracowanie własne na podstawie International Hop Growers' Convention Economic Commission Summary Reports 2012–2021 (7)

W 2021 r. chmiel w Polsce uprawiano na powierzchni 1 758,45 ha, a plantacje były zlokalizowane w dziewięciu województwach (tab. 6). Największa koncentracja uprawy chmielu występuje w województwie lubelskim. Dominacja tego rejonu jest bardzo duża, bowiem zlokalizowane jest tu 84% całego polskiego areалу chmielu, a uprawę prowadzi aż 625 plantatorów, co stanowi 94% wszystkich producentów chmielu w Polsce. Średnia powierzchnia plantacji chmielu w Polsce jest niewielka, bowiem nie przekracza 3 ha, ale dane Inspekcji Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych wskazują na utrzymujący się od wielu lat powolny, ale stały trend wzrostowy. W ostatniej dekadzie średnia powierzchnia plantacji wzrosła z 2,30 ha w 2012 r. do 2,65 ha w 2021 r. Największe pod względem obszarowym plantacje chmielu znajdują się w województwach opolskim i wielkopolskim, natomiast najbardziej rozdrobniona jest uprawa chmielu w województwach świętokrzyskim i lubelskim (tab. 6).

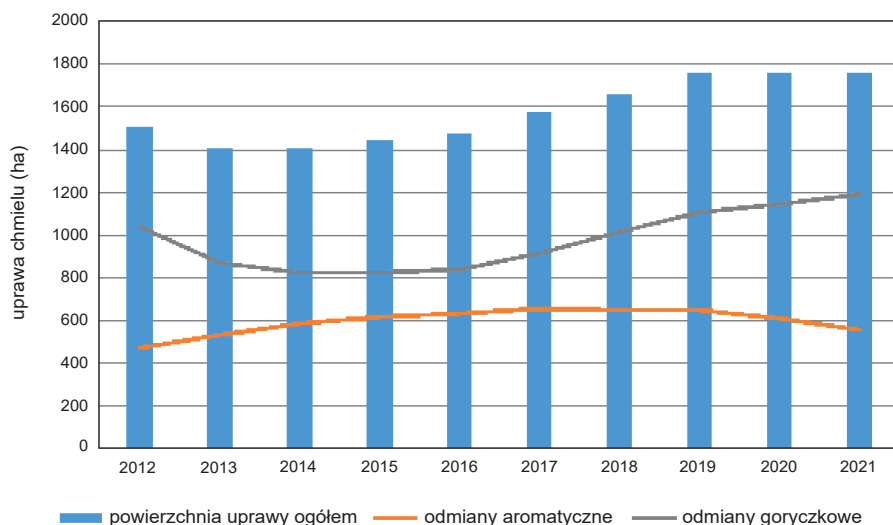
Tabela 6

Rozmieszczenie uprawy chmielu w Polsce w 2021 r.

Województwo	Powierzchnia uprawy chmielu (ha)	Udział w ogólnym areale (%)	Liczba producentów chmielu	Średnia powierzchnia plantacji (ha)
Dolnośląskie	5,88	0,33	1	5,88
Opolskie	14,10	0,80	1	14,10
Śląskie	1,15	0,07	1	1,15
Wielkopolskie	158,66	9,02	22	7,21
Kujawsko-pomorskie	9,60	0,55	2	4,8
Lubelskie	1530,52	87,04	625	2,45
Mazowieckie	22,01	1,25	6	3,67
Podkarpackie	14,14	0,80	4	3,54
Świętokrzyskie	2,39	0,14	2	1,20
<b>Razem</b>	<b>1758,45</b>	<b>100</b>	<b>664</b>	<b>2,65</b>

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych Inspekcji Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych za 2021 r.

W analizowanej dekadzie (2012–2021) powierzchnia uprawy chmielu w Polsce wahała się od 1 407 ha w 2013 r. do 1 762 ha w 2019 r., przy średniej za cały okres 1 576 ha. Największe wzrosty areалу, o 5–7% rocznie, obserwowano w latach 2017–2019 (rys. 11). Od 2019 r. powierzchnia uprawy chmielu w Polsce ustabilizowała się na poziomie około 1 760 ha. Duże zmiany obserwowano również w strukturze odmianowej. Wprawdzie w całym analizowanym okresie dominowały w uprawie odmiany goryczkowe, ale ich udział wahał się od 69% w 2012 r. do 57% w latach 2015–2016. O ile w pierwszej połowie omawianej dekady obserwowano systematyczny spadek powierzchni uprawy odmian goryczkowych przy jednoczesnym wzroście areálu odmian aromatycznych, to w ostatnich latach tendencja ta odwróciła się (rys. 11). W konsekwencji, w 2021 r. struktura odmianowa nasadzeń chmielu w Polsce była bardzo zbliżona do tej z 2012 r., tj. odmiany goryczkowe zajmowały 68%, a aromatyczne 32% areálu. Zmiany, jakie zachodziły w ostatniej dekadzie w strukturze nasadzeń, wynikały przede wszystkim z preferencji odbiorców surowca oraz z sytuacji na rynku światowym. Znaczący wzrost areálu odmian aromatycznych w latach 2015–2016, szczególnie w USA, zaspokoił potrzeby rynku, a nawet doprowadził do nadprodukcji surowca z tego typu odmian. Konsekwencją było zmniejszenie popytu. Sektor uprawy chmielu w Polsce dość szybko zareagował na tę sytuację poprzez systematyczne zwiększanie powierzchni uprawy odmian goryczkowych, które ma miejsce już od 2017 r.



Rys. 11. Powierzchnia uprawy chmielu w Polsce w latach 2012–2021

Źródło: opracowanie własne na podstawie raportów KE 2012–2020 (4) oraz danych Inspekcji Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych

W ostatniej dekadzie zmienił się również asortyment uprawianych odmian chmielu (tab. 7). Liczba odmian pozostających w uprawie wzrosła z 9 w 2012 r. do 23 w 2021 r. Do uprawy wprowadzono dwie odmiany wyhodowane w IUNG-PIB, tj. Puławski i Magnat. Szczególnie ta ostatnia, w typie gorzki, zyskała duże uznanie, bowiem jej areał w ciągu ośmiu lat wzrósł do ponad 200 ha. W poszukiwaniu ciekawych i oryginalnych nut smakowo-zapachowych surowca, głównie na potrzeby browarów lokalnych i rzemieślniczych, sięgnięto po trochę zapomniane już odmiany polskie, takie jak: Izabella, Oktawia, Książęcy, Nadwiślański czy Tomyski, ale również wprowadzono do uprawy odmiany amerykańskie (Cascade, Centennial, Chinook, Crystal, Nuggett, Willamette), a nawet francuską odmianę Triskel. Odmiany te są uprawiane na niewielką skalę, na powierzchniach nieprzekraczających kilku hektarów, często jedynie przez pojedynczych producentów.

Tabela 7

Powierzchnia uprawy poszczególnych odmian chmielu w Polsce w latach 2012–2021

Odmiana chmielu	Powierzchnia uprawy (ha)										Różnica między latami 2012–2021 (ha)
	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	
Odmiany goryczkowe											
Marynka	462,9	338,2	302,5	294,5	273,0	273,1	310,5	338,5	334,5	331,8	-131,1
Hallertauer Magnum	510,2	499,6	501,7	495,5	494,0	520,2	556,7	604,3	629,7	639,1	+28,9
Iunga	5,7	3,8	4,0	5,0	4,8	9,7	12,0	12,0	7,0	9,6	+3,9
Taurus	10,0	3,7	8,9	8,2	6,7	7,7	3,7	5,3	4,2	1,6	-8,4
Magnat	-	-	0,45	13,6	61,7	102,3	125,9	140,8	156,4	202,6	
Izabella	-	-	-	-	0,1	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	
Chinook	-	-	-	-	2,1	2,0	2,2	3,1	3,91	3,8	
Oktawia	-	-	-	-	0,5	0,8	2,2	4,0	4,8	4,4	
Nugget								0,4	0,4	0,4	
Zula							1,2	1,9	1,9	1,5	
Odmiany aromatyczne											
Lubelski	296,6	318,8	368,6	383,8	414,9	419,3	404,5	389,2	359,2	324,8	+28,2
Lomik	7,4	4,6	3,8	4,1	3,1	2,8	2,7	3,3	0,8	0,5	-6,9
Perle	88,2	62,7	61,9	61,1	49,1	48,8	44,1	62,0	72,1	63,7	-24,5
Sybilla	48,3	49,1	70,7	77,1	84,8	98,5	109,5	108,2	99,4	90,3	+42,0
Hallertauer Tradition	79,1	74,4	80,0	77,7	73,1	70,4	61,3	63,2	56,3	61,4	-17,7
Puławski	-	-	-	0,3	3,2	6,7	6,5	6,5	6,1	4,8	
Cascade	-	-	-	0,3	3,6	9,8	11,4	10,1	10,0	9,6	
Tomyski							0,9	1,2	1,4	1,4	
Żatecki							2,5	3,2	4,0	3,8	
Willamette							0,4	0,9	0,9	0,4	
Centennial							0,7	0,7	0,5	0,4	
Książęcy								0,1	0,5	0,4	
Triskel							1,4	1,6	1,4	-	
Nadwiślański								-	0,2	-	
Crystal							0,1	0,1			

Źródło: opracowanie własne na podstawie raportów Inspekcji Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych

W Polsce produkuje się średnio około 2 700 t szyszek chmielowych rocznie, co stanowi 2,5% światowej produkcji chmielu. W ostatniej dekadzie obserwowano dość duże zróżnicowanie wielkości produkcji wynikające głównie z wpływu warunków

pogodowych na plonowanie roślin, ale również ze zmian areału oraz asortymentu uprawianych odmian. Przeciętny plon chmielu w analizowanym okresie wynosił  $1,84 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ , ale wahał się on od  $1,29 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$  w 2012 r. do  $2,18 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$  w 2016 r. (tab. 8). Odmiany goryczkowe dawały plon o blisko 25% większy w porównaniu z aromatycznymi, co jest ich cechą charakterystyczną. Konsekwencją wyższego potencjału plonowania oraz większego udziału odmian goryczkowych w strukturze nasadzeń jest znacząca przewaga tych odmian w produkcji surowca. Biorąc pod uwagę średnią za lata 2012–2021, surowiec z odmian goryczkowych stanowił 67% całej produkcji chmielu w Polsce (tab. 8).

Tabela 8

Wielkość produkcji oraz plonowanie odmian aromatycznych i goryczkowych chmielu w Polsce w latach 2012–2021

Wskaźnik	Typ odmiany	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	Średnia 2012–2021
Wielkość produkcji (t)	aromatyczne	557	793	784	826	1118	1072	1086	1134	811	851	<b>903</b>
	goryczkowe	1261	1628	1288	1416	1926	1876	2082	2416	2217	2257	<b>1837</b>
	<b>ogółem</b>	<b>1818</b>	<b>2421</b>	<b>2072</b>	<b>2242</b>	<b>3044</b>	<b>2948</b>	<b>3168</b>	<b>3550</b>	<b>3028</b>	<b>3108</b>	<b>2740</b>
Plonowanie ( $\text{t} \cdot \text{ha}^{-1}$ )	aromatyczne	1,28	1,73	1,52	1,44	1,86	1,72	1,71	1,78	1,36	1,54	<b>1,59</b>
	goryczkowe	1,24	1,90	1,59	1,79	2,42	2,21	2,20	2,37	2,06	1,98	<b>1,98</b>
	<b>ogółem</b>	<b>1,29</b>	<b>1,86</b>	<b>1,59</b>	<b>1,64</b>	<b>2,18</b>	<b>2,01</b>	<b>2,00</b>	<b>2,14</b>	<b>1,81</b>	<b>1,84</b>	<b>1,84</b>

Źródło: opracowanie własne na podstawie raportów KE 2012-2020 (4) oraz danych Inspekcji Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych

Dominacja odmian goryczkowych jest jeszcze bardziej widoczna, jeśli weźmiemy pod uwagę produkcję alfa kwasów, bowiem odmiany goryczkowe charakteryzują się nie tylko wyższym plonowaniem, ale również większą zawartością tych składników w szyszkach w porównaniu z odmianami aromatycznymi. W latach 2012–2021 średnia zawartość alfa kwasów w szyszkach odmian goryczkowych i aromatycznych kształtowała się na poziomie odpowiednio: 10,7% i 4,4%. W konsekwencji ponad 82% alfa kwasów wyprodukowanych w Polsce pochodzi z uprawy odmian goryczkowych, a jedynie 18% z odmian aromatycznych (tab. 9).

Tabela 9

Produkcja alfa kwasów oraz średnia zawartość tych substancji w szyszkach odmian aromatycznych i goryczkowych chmielu w Polsce w latach 2012–2020

Wskaźnik	Typ odmiany	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Średnia 2012–2020
Średnia zawartość alfa kwasów (%)	aromatyczne	4,7	4,8	4,0	3,8	4,2	4,4	3,6	4,8	5,3	4,4
	goryczkowe	11,3	10,5	10,4	9,6	11,1	10,5	11,5	10,3	11,1	10,7
	<b>średnia</b>	<b>9,3</b>	<b>8,6</b>	<b>8,0</b>	<b>7,4</b>	<b>8,6</b>	<b>8,4</b>	<b>8,8</b>	<b>8,4</b>	<b>9,4</b>	<b>8,5</b>
Produkcja alfa kwasów (t)	aromatyczne	24,9	37,9	30,8	31,0	47,4	48,0	41,0	62,0	58,0	42,3
	goryczkowe	139,8	168,8	131,8	136,0	214,7	201,0	239,0	255,0	283,0	196,6
	<b>ogółem</b>	<b>164,6</b>	<b>206,7</b>	<b>162,5</b>	<b>167,0</b>	<b>262,0</b>	<b>248,0</b>	<b>280,0</b>	<b>317,0</b>	<b>341,0</b>	<b>238,8</b>

Źródło: opracowanie własne na podstawie raportów KE 2012-2020 (4)

Większość chmielu wyprodukowanego w Polsce trafia na rynek światowy, gdzie wraz z chmielem wyprodukowanym w innych krajach jest wykorzystywany głównie przez przemysł piwowarski. Branża piwowarska w ostatnich latach odnotowuje spadki produkcji, a kryzysową sytuację pogłębiła pandemia COVID-19. W 2020 r. konsumpcja piwa w krajach Unii Europejskiej zmniejszyła się o blisko 8% w stosunku do roku 2019 (3). W tym samym czasie produkcja spadła o 6%. Podobne tendencje obserwowano w Polsce, gdzie w 2020 r. konsumpcja piwa osiągnęła najniższą od 10 lat wartość, tj. 93,6 l na jednego mieszkańca, równocześnie o około 4% zmniejszyła się produkcja piwa (12). Niestety, bardzo duże uzależnienie produkcji chmielu od przemysłu piwowarskiego sprawia, że problemy tej branży dotyczą również sektor chmielarski. Według danych Komisji Europejskiej (4) ceny kontraktowe chmielu w Polsce w 2020 r. były o 12,2% niższe w porównaniu z rokiem 2019. W przypadku cen wolnorynkowych różnica ta była jeszcze większa i wynosiła 25,2%. W 2020 r. po raz pierwszy od wielu lat ceny wolnorynkowe chmielu w Polsce były niższe od kontraktowych, a różnica kształtowała się na poziomie 6%. Niepokojący jest również znaczny wzrost ilości chmielu, który nie znalazł nabywcy. O ile w 2019 r. chmiel niesprzedany stanowił około 1,1% całego wyprodukowanego w Polsce, to w roku 2020 było to już 3,9%. Obserwowane zmiany są wynikiem zmniejszenia popytu na surowiec. Niestety, dane dotyczące cen skupu chmielu publikowane przez MRiRW (13) wskazują, że w 2021 r. ceny chmielu pozostawały na poziomie zbliżonym do roku 2020, a w przypadku niektórych odmian, takich jak Marynka czy Sybilla, odnotowano nawet spadek cen w granicach 6–7%. Analiza sytuacji na światowym rynku chmielu wskazuje na pogłębiającą się od kilku lat nadprodukcję alfa kwasów, dlatego nawet w obliczu prognozowanego wzrostu produkcji piwa wynikającego z zakończenia pandemii nie należy spodziewać się w najbliższej perspektywie radykal-



nego zwiększenia zapotrzebowania na surowiec chmielowy. Oznacza to zamrożenie, a nawet spadek cen skupu chmielu, co w połączeniu z dużymi wzrostami cen środków produkcji wpłynie będzie negatywnie na opłacalność produkcji chmielu.

### Literatura

1. BarthHaas Report, Hops 2012/2013 – 2020/2021 ([www.barthhaasgroup.com](http://www.barthhaasgroup.com)).
2. Brewers Association for Small and Independent Craft Brewers (<https://www.brewersassociation.org/statistics-and-data/national-beer-stats/>).
3. Brewers of Europe, European beer trends statistic report/2021 edition (<https://brewersofeurope.org>)
4. European Commission, Hop Harvest Reports 2012-2020 ([https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/plants-and-plant-products/plant-products/hops/hops-reports\\_pl](https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/plants-and-plant-products/plant-products/hops/hops-reports_pl)).
5. Hop Growers of America. Statistical report 2017 and 2021 (<https://www.usahops.org/enthusiasts/stats.htm>).
6. Hopsteiner Committed to the Brewer, Guidelines for Hop Buying 2012-2021. (<https://www.hopsteiner.com/news/type/guidelines/>).
7. International Hop Growers' Convention Economic Commission Summary Reports 2012–2021 (<http://www.hmelj-giz.si/ihgc/act.htm>).
8. M r o z n y M., T o l a s z R., N e k o v a r J., S p a r k s T., T r n k a M., Z a l u d Z. The impact of climate change on yield and quality of Saaz hops in the Czech Republic. *Agricultural and Forest Meteorology*, 2009, **149**: 913-919.
9. P a v l o v i c V., P a v l o v i c M., C e r e n a k A., K o s i r I. J., C e h B., R o z m a n C., T u r k J., P a z e k K., K r o f t a K.: Gregoric G. Environment and weather influence on quality and market value of hops. *Plant Soil Environ.*, 2012, **58**: 155-160.
10. S k o m r a U.: Stan aktualny i perspektywy uprawy chmielu w Polsce. *Studia i Raporty IUNG-PIB* 2012, **31(5)**: 9-20.
11. S r e ć e c S., K v a t e r n j a k I., K a u ć i ć D., Š p o l j a r A., E r h a t i ć R.: Influence of climatic conditions on accumulation of  $\alpha$ -acids in hop cones. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 2008, **73(3)**: 161-166.
12. Wysokie inflacja i akcyza oraz COVID ciągną rynek piwa w dół. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 2022, **2**: 3.
13. Zintegrowany System Rolniczej Informacji Rynkowej, Rynek Chmielu ([www.minrol.gov.pl/Rynki-rolne/Zintegrowany-System-Rolniczej-Informacji-Rynkowej/Biuletyny-Informacyjne/Rynek-chmielu](http://www.minrol.gov.pl/Rynki-rolne/Zintegrowany-System-Rolniczej-Informacji-Rynkowej/Biuletyny-Informacyjne/Rynek-chmielu)).

---

Adres do korespondencji:

*dr Urszula Skomra*  
*Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin*  
*IUNG-PIB*  
*ul. Czartoryskich 8*  
*24-100 Puławy*  
*tel. 81 4786 943*  
*e-mail: Urszula.Skomra@iung.pulawy.pl*

---

AUTOR  
Urszula Skomra

ORCID  
0000-0003-0996-7341

W serii wydawniczej „RAPORTY PIB”, a od 2007 r. „STUDIA I RAPORTY IUNG-PIB” ukazały się następujące pozycje:

1. *Wybrane aspekty agrochemicznych badań gleby*. Puławy, 2006.
2. *Zasady wprowadzania nawozów do obrotu*. Puławy, 2006.
3. *Regionalne zróżnicowanie produkcji rolniczej w Polsce*. Puławy, 2006.
4. *Monitoring skutków środowiskowych planu rozwoju obszarów wiejskich*. Puławy, 2007.
5. *Sprawdzenie przydatności wskaźników do oceny zrównoważonego gospodarowania zasobami środowiska rolniczego w wybranych gospodarstwach, gminach i województwach*. Puławy, 2007.
6. *Możliwości rozwoju rolnictwa ekologicznego w Polsce*. Puławy, 2007.
7. *Współczesne uwarunkowania organizacji produkcji w gospodarstwach rolniczych*. Puławy, 2007.
8. *Efektywne i bezpieczne metody regulacji zachwaszczenia, nawożenia i uprawy roli*. Puławy, 2007.
9. *Wybrane elementy technologii produkcji roślinnej*. Puławy, 2007.
10. *Problem erozji gleb w procesie przemian strukturalnych na obszarach wiejskich*. Puławy, 2008.
11. *Uprawa roślin energetycznych a wykorzystanie rolniczej przestrzeni produkcyjnej w Polsce*. Puławy, 2008.
12. *Wybrane zagadnienia systemów informacji przestrzennej i obszarów problemowych rolnictwa w Polsce*. Puławy, 2008.
13. *Tworzenie postępu biologicznego w hodowli tytoniu i chmielu*. Puławy, 2008.
14. *Kierunki zmian w produkcji roślinnej w Polsce do roku 2020*. Puławy, 2009.
15. *Wybrane elementy regionalnego zróżnicowania rolnictwa w Polsce*. Puławy, 2009.
16. *Systemy wspomagania decyzji w zrównoważonej produkcji roślinnej*. Puławy, 2009.
17. *Stan i kierunki zmian w produkcji rolniczej (wybrane zagadnienia)*. Puławy, 2009.
18. *Produkcyjne i środowiskowe aspekty współczesnych metod nawożenia i regulacji zachwaszczenia*. Puławy, 2009.
19. *Oddziaływanie rolnictwa na środowisko przyrodnicze w warunkach zmian klimatu*. Puławy, 2010.
20. *Ocena zrównoważenia gospodarowania zasobami środowiska rolniczego w wybranych gospodarstwach, gminach, powiatach i województwach*. Puławy, 2010.
21. *Możliwości rozwoju obszarów problemowych rolnictwa (OPR) w świetle PROW 2007–2013*. Puławy, 2010.
22. *Możliwości rozwoju gospodarstw o różnych kierunkach produkcji rolniczej w Polsce*. Puławy, 2010.
23. *Związki fitogeniczne jako naturalna alternatywa antybiotykowych promotorów wzrostu*. Puławy, 2010.
24. *Wybrane aspekty przemian strukturalnych na obszarach wiejskich*. Puławy, 2010.
25. *Stan obecny i perspektywy nawożenia roślin w Polsce w aspekcie regulacji prawnych*. Puławy, 2010.
26. *Stan obecny i perspektywy rozwoju rolnictwa ekologicznego w Polsce*. Puławy, 2010.
- 27(1). *Środowiskowe skutki działalności rolniczej i wdrażania PROW na obszarach problemowych rolnictwa*. Puławy, 2011.

- 28(2). *Techniki i technologie stosowane w produkcji roślinnej a środowisko przyrodnicze*. Puławy, 2012.
- 29(3). *Problemy zrównoważonego gospodarowania w produkcji rolniczej*. Puławy, 2012.
- 30(4). *Doskonalenie integrowanych technologii produkcji zbóż jarych i roślin pastewnych ze szczególnym uwzględnieniem początkowych elementów agrotechniki*. Puławy, 2012.
- 31(5). *Rola badań naukowych w kształtowaniu postępu w produkcji chmielu i tytoniu*. Puławy, 2012.
- 32(6). *Wybrane aspekty zrównoważonego rozwoju i specjalizacji gospodarstw rolniczych*. Puławy, 2013
- 33(7). *Działalność Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa-PIB w Puławach w zakresie wspierania doradztwa i praktyki rolniczej*. Puławy, 2013.
- 34(8). *Problemy gospodarki nawozowej w Polsce*. Puławy, 2013.
- 35(9). *Zagrożenia dla prawidłowego funkcjonowania gleb użytkowanych rolniczo – wybrane zagadnienia*. Puławy, 2013.
- 36(10). *Zmiany w technologiach produkcji roślinnej – oceny i wpływ na środowisko rolnicze*. Puławy, 2014.
- 37(11). *Dobre praktyki w nawożeniu*. Puławy, 2014.
- 38(12). *Jakość informacji w systemach wspomagania decyzji*. Puławy, 2014.
- 39(13). *Wykorzystanie odnawialnych źródeł energii pochodzenia rolniczego i ich wpływ na środowisko*. Puławy, 2014.
- 40(14). *Wybrane problemy rolnictwa polskiego z uwzględnieniem stanu jego zrównoważenia*. Puławy, 2014.
- 41(15). *Technologie produkcji zbóż i roślin pastewnych warunkujące wysoki plon i dobrą jakość*. Puławy, 2014.
- 42(16). *Podstawy nowoczesnego doradztwa nawozowego w Polsce*. Puławy, 2015.
- 43(17). *Wybrane problemy produkcji rolniczej z uwzględnieniem aspektu dóbr publicznych*. Puławy, 2015.
- 44(18). *Wybrane zagadnienia produkcji roślinnej w Polsce*. Puławy, 2015.
- 45(19). *Kształtowanie żyzności gleby*. Puławy, 2015.
- 46(20). *Wybrane zagadnienia związane z ochroną gleb przed degradacją*. Puławy, 2015.
- 47(1). *Problemy produkcji rolniczej w Polsce w kontekście ich oddziaływania na środowisko*. Puławy, 2016.
- 48(2). *Innowacje w nawożeniu*. Puławy, 2016.
- 49(3). *Siedliskowe i agrotechniczne uwarunkowania produkcji roślinnej w Polsce*. Puławy, 2016.
- 50(4). *Technologie produkcji roślinnej w warunkach zmieniającego się klimatu*. Puławy, 2016.
- 51(5). *Krajowe bazy danych o glebach*. Puławy, 2017.
- 52(6). *Redukcja emisji gazów cieplarnianych i amoniaku oraz metody adaptacji do zmian klimatu (wybrane zagadnienia)*. Puławy, 2017.
- 53(7). *Nawożenie a środowisko*. Puławy, 2017.
- 54(8). *Jakość gleb użytkowanych rolniczo i wskaźniki jej oceny*. Puławy, 2017.
- 55(9). *Uwarunkowania i kierunki zmian produkcji rolniczej w Polsce*. Puławy, 2018.
- 56(10). *Aktualne problemy nawożenia*. Puławy, 2018.
- 57(11). *Technologie produkcji roślinnej w warunkach zmieniającego się klimatu*. Puławy, 2018.

- 58(12).** *Stan zagrożeń dla jakości gleb w Polsce.* Puławy, 2018.
- 59(13).** *Środowiskowe aspekty gospodarki nawozowej.* Puławy, 2019.
- 60(14).** *Znaczenie postępu biologicznego i technologicznego w produkcji zbóż i roślin strączkowych.* Puławy, 2019
- 61(15).** *Wybrane zagadnienia agrotechniki roślin uprawnych.* Puławy, 2020.
- 62(16).** *Uwarunkowania i perspektywy rozwoju produkcji rolniczej w różnych regionach Polski.* Puławy, 2020.
- 63(17).** *Nawożenie – aspekty produkcyjne i środowiskowe.* Puławy, 2020.
- 64(18).** *Zagrożenia dla jakości gleb w Polsce – część II.* Puławy, 2020.
- 65(19).** *Teoretyczne podstawy racjonalnego nawożenia.* Puławy, 2021.
- 66(20).** *Zrównoważone użytkowanie i ochrona gleb jako element Europejskiego Zielonego Ładu.* Puławy, 2021.
- 67(21).** *Rolnictwo polskie wobec wyzwań klimatycznych.* Puławy, 2022.

## WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

W serii wydawniczej „STUDIA I RAPORTY IUNG-PIB” publikowane są recenzowane prace z zakresu agronomii oraz ochrony i kształtowania środowiska rolniczego, wykonane w ramach zadań programów wieloletnich pn. „Kształtowanie środowiska rolniczego Polski oraz zrównoważony rozwój produkcji rolniczej” (2005-2010) oraz „Wspieranie działań w zakresie kształtowania środowiska rolniczego i zrównoważonego rozwoju produkcji rolniczej w Polsce” (2011-2015). W zeszytach problemowych o charakterze monografii, wydawanych w ramach tej serii, mogą być zamieszczane również prace autorów spoza IUNG-PIB, które merytorycznie mieszczą się w tematyce zadań programu wieloletniego. **Publikowane są prace problemowe, głównie mające charakter przeglądowy, z podkreśleniem znaczenia omawianych zagadnień dla rolnictwa polskiego.**

### Wydruk tekstu do recenzji:

czcionka 12 p., z odstępem 1,5-wierszowym.

### Przygotowanie do druku:

- tekst i tabele w programie Word,
- czcionka – Times New Roman
- układ pracy: słowa kluczowe, wstęp, wyniki i dyskusja bądź omówienie wyników, podsumowanie lub wnioski, literatura, dane kontaktowe, nr ORCID

### tekst

- czcionka – 11 p. (spis pozycji literatury – 9 p.)
- wcięcie akapitowe – 0,5 cm

### tabele

- podział na wiersze i kolumny (z funkcji tworzenia tabel)
- szerokość dokładnie 13 cm (tabele w pionie) lub 19 cm (tabele w poziomie)
- czcionka 9 p., pojedyncze odstęp międzywierszowe
- pod tabelą przypis ze wskazaniem źródła danych (autorstwa)

### rysunki/fotografie

- czarno-białe/kolorowe (możliwie duża rozdzielczość)
- wykresy w programie Word lub Excel
- wymiary w zakresie 13 cm × 19 cm
- w podpisach czcionka 9 p.
- na nośniku lub w oddzielnych plikach
- pod rysunkiem przypis ze wskazaniem źródła danych (autorstwa)

### jednostki miary

- system SI
- jednostki zapisywać potęgowo (np. t·ha<sup>-1</sup>)

### literatura

- spis literatury na końcu pracy w układzie alfabetycznym wg nazwisk autorów, w kolejności: nazwisko (pismo rozstrzelone), pierwsza litera imienia, tytuł pracy, miejsce publikacji: tytuł wydawnictwa (wg ogólnie przyjętych skrótów tytułów czasopism), rok, numer (pismo pogrubione), strony,
- cytowanie w tekście – jako numer pozycji ze spisu literatury (w nawiasach okrągłych) lub dodatkowo z nazwiskiem autora (pismo rozstrzelone).

Pracę do recenzji należy złożyć w 1 egzemplarzu. Po recenzji oryginalny egzemplarz recenzowany złożyć/przesłać do Redakcji, a ostateczną wersję pracy, uwzględniającą uwagi recenzenta i redaktora, przesłać e-mailem.

Dane kontaktowe:

mgr Ewa Decka-Cywińska

Dział Upowszechniania i Wydawnictw IUNG-PIB

ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy

e-mail: edeka@iung.pulawy.pl



ISBN 978-83-7562-390-1  
Publikacja elektroniczna

Egzemplarz bezpłatny