

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* × *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 polowa 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 bielcowej, 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 łodygi, ryzoktonioza 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 łodygi (% roślin porażonych)	Ryzoktonioza 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 (mieszańce 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 mieszańce 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 męskojąlowe 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