

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 ziemniaka, 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 glauca*. Na dolnym, inokulowanym wcześniej liściu (z prawej strony) widoczne są objawy nadwrażliwości w postaci małych nekrotycznych plamek

## 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 biwaleatów, 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.

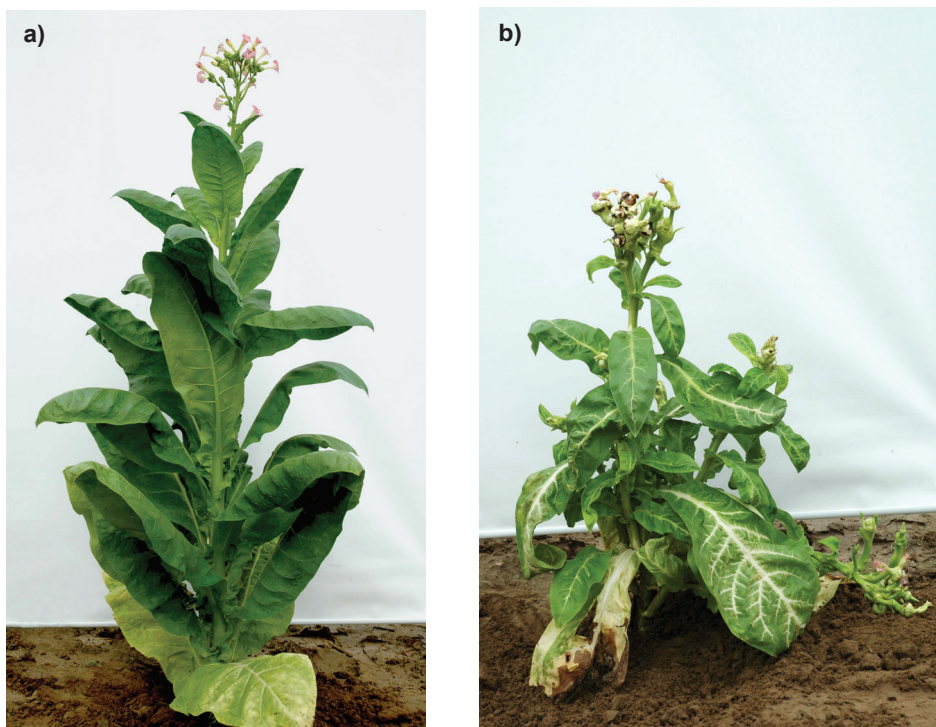
Moon i Nicholson (21) opracowali markery molekularne sprzężone z odpornością na TSWV u odmiany Polalta. W tym celu najpierw otrzymali pokolenia  $F_1$  i  $F_2$  pochodzące z krzyżowania tej odmiany z odmianą podatną – K326. Test inokulacji wykonany na segregującej populacji  $F_2$  potwierdził, że odporność 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 wykazywało 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  $F_2$  otrzymanej z krzyżowania wybranych linii DH z WAC 121D7 (wysokoplenną odmianą tytoniu papierosowego jasnego). Wśród 1550 roślin  $F_2$  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  $F_2$  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., Gołnik 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., Czubačka 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., Czubačka 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