

Anna Depta

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

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

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

Wstęp

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

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

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

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

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

Charakterystyka PVY i reakcje roślin na infekcję

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

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

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



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

Źródło: A. Depta

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

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

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

Prace hodowlane wykorzystujące różne źródła odporności na PVY

Odporność w obrębie gatunku *Nicotiana tabacum*

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

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

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

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

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

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

Odporność na PVY warunkowana genami recesywnymi jest w zasadzie mechanizmem polegającym na utracie podatności spowodowanej brakiem możliwości interakcji białka VPg z czynnikiem inicjacji translacji *elF4E* (81). Delecja całego genu *elF4E-1*, jak w przypadku odmiany VAM, gwarantuje najwyższą odporność. Następuje wówczas nadekspresja genu *elF4E-2*, z którym wirus tworzy нефunkcjonalne połączenia. Nadekspresja tego genu może być dodatkowo wzmocniona, gdy brakuje genu *elF4E-3*, a występuje hybryda *elF4E²⁻³*. Przedstawiona powyżej odporność typu *va* nie gwarantuje pełnej immunii na wszystkie szczepy PVY, gdyż wirus ten jest w stanie

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

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

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

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

Odporność pochodząca od dzikich gatunków z rodzaju *Nicotiana*

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

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

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

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

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

zapewniała częściową ochronę przed nekrozami. Dodatkowe chromosomy pochodzące od *N. africana* w linii addycyjnej NC152 zostały następnie oznakowane zmutowanym transgenem *dhfr* warunkującym odporność na metotreksat (10). Uzyskana w ten sposób linia została wykorzystana przez Lewisa (51) do oceny stopnia transferu genów pochodzących od *N. africana* do tytoniu uprawnego. W tym celu zastosowano zarówno metody klasycznej hodowli poprzez krzyżowanie z podatną odmianą Petite Havana, jak również z zastosowaniem kultur tkankowych. Następnie z pokolenia BC₁F₁ badacze wyselekcjonowali obiekty odporne na PVY NN i zawierające 48 chromosomów, które poddali krzyżowaniu z podatną odmianą K326 w celu przeniesienia fragmentu *Nafr* odpowiedzialnego za odporność na PVY. Na bazie odmiany K326 Lewis (50) uzyskał prawie izogeniczne linie posiadające różne kombinacje odporności i tolerancji na PVY, obejmujące zarówno recesywny gen *va*, jak i fragment *Nafr*. Badania odpornościowe wykazały zróżnicowany stopień odporności uzyskanych linii, który zależał od zjadliwości użytego izolatu PVY, a cecha ta wykazywała charakter częściowo dominujący (51).

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

Odporność uzyskana w wyniku transformacji genetycznej

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

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

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

Ze względu na to, że tytoń łatwo ulega transformacji za pomocą bakterii *A. tumefaciens*, podjęto próby wykorzystania tej metody do uzyskania roślin transgenicznych tytoniu odpornych na choroby wirusowe, poprzez transformowanie ich genami pochodzącymi od wirusa. Odporność ta, zwana odpornością pochodzącą od patogenu (PDR, ang. *Pathogen derived resistance*), opiera się na naturalnym zjawisku krzyżowym (ang. *Cross-protection*), gdzie inokulacja roślin słabymi szczepami wirusa zabezpiecza je przed szczepami bardziej wirulentnymi (71). Zastosowanie niezmodyfikowanych patogenów powodowało skutki uboczne, dlatego opracowano metodę wprowadzenia wybranych genów patogenu do genomu biorcy (69). W tym celu wykorzystywano m.in. geny kodujące białko płaszczka wirusa (CP, ang. *coat protein*) oraz gen kodujący wirusową replikazę (11, 64). Transformacja tytoniu w kierunku odporności na PVY była przedmiotem wielu badań. Sudarsono i in. (77) wykorzystali gen białka płaszczka PVY (CP) pochodzącego z chilijskiego izolatu PVY i uzyskali jedynie 5–12% roślin pokolenia R₀ uznawanych za odporne, a Kollar i in. (43) użyli węgierskiego

izolatu PVY-H i uzyskali w pokoleniu R_1 rośliny o dużej zmienności pod względem odporności na PVY-H. Zastosowanie genu białka płaszczka wirusa mozaiki sałaty LMVCP do transformacji odmiany Xanthi pozwoliło wyodrębnić dwie linie spośród pięciu badanych, które były całkowicie odporne, a wśród pozostałych znaczna część nie miała objawów chorobowych (23). Park i in. (63) użyli cDNA genu replikazy PVY w transformacji tytoniu odmiany Burley 21 i uzyskali wysoki wskaźnik roślin odpornych.

Transformację tytoniu metodą krążków liściowych na pożywcę selekcyjnej z kanamycyną w celu uzyskania odporności na PVY przeprowadziła również Doroszevska (31). Do badań wykorzystano cztery odmiany uprawne w typie papierosowym jasnym, posiadające dobre cechy jakościowe, lecz silnie podatne na PVY: MacNair 944, K326, By103 i AC Gayed. Transformacja była prowadzona przy użyciu konstrukcji pROKY, która niosła zmodyfikowany gen polimerazy PVY i była przygotowana w dwóch orientacjach: sensownej i antysensownej, a także przy użyciu konstrukcji LMVCP, która niosła gen płaszczka wirusa mozaiki sałaty. Efektywność transformacji wynosiła 40–50% regeneracji roślin posiadających transgen. Uzyskane wyniki testów odpornościowych wskazały, że 17,6% roślin pokolenia T_0 posiadało wysoką odporność na PVY i nie zaobserwowano wyraźnych różnic w zależności od użytej konstrukcji i odmiany. Nieco bardziej zróżnicowane wyniki pod względem transferu transgenu i stopnia odporności uzyskano dla pokolenia T_1 . Najlepsze kiełkowanie i wzrost roślin zaobserwowano dla roślin pochodzących z transformacji konstrukcją LMVCP. Stopień odporności roślin zależał od odmiany i był najwyższy dla linii AC Gayed i MacNair 944. Wysoką odporność na PVY wykazywało ogółem 35,5% roślin pokolenia T_1 . Również pokolenie T_2 wykazywało zróżnicowanie pod względem obecności transgenu, jak i stopnia odporności na PVY. Ogółem 47,3% roślin pokolenia T_2 było wysoce odpornych na PVY, a wśród nich były linie, gdzie odporność przekraczała 80%. Uzyskane przez Doroszevską (31) wyniki w pokoleniach T_0 - T_2 wszystkich linii z udziałem trzech konstrukcji wskazują na wzrost odporności roślin transgenicznnych na PVY.

Stabilność cechy odporności na PVY w pokoleniach T_2 - T_4 była przedmiotem badań Doroszevskiej i Czubackiej (28). W tym celu użyto trzech izolatów PVY o różnej zjadliwości. Najskuteczniejszą ochronę zapewniły konstrukcje LMVCP i ROKY2, a najmniejszą – ROKY1. Uwzględniając odmiany, najlepiej wypadły odmiany AC Gayed i MacNear 944, a najgorzej – K326. W pokoleniu T_4 linia MacNair 944 LMVCP była odporna na wszystkie zastosowane izolaty, a odmiana AC Gayed niestety uległa częściowemu porażeniu w postaci nekroz nerwów. Kolejne testy odpornościowe na czterech transgenicznnych liniach tytoniu w pokoleniach T_2 - T_4 zostały wykonane przy użyciu trzech nekrotycznych szczepów PVY (18). Uzyskane wyniki były zbieżne z uzyskanymi wcześniej, wskazując, że najlepszą ochronę zapewnia konstrukcja LMVCP i ROKY2 (28). Badania molekularne wykazały stabilizację dziedziczenia transgenu w kolejnych pokoleniach. Jednakże jego obecność nie za-

wsze zapewniała ochronę przed PVY. Rośliny transgeniczne z konstrukcją ROKY1 były odporne na PVY^{NW} w 60% w pokoleniu T₂, ale już w pokoleniu T₄ tylko 2,7% osobników było odpornych na ten izolat PVY. Utrata odporności może być związana ze wzrostem metylacji wstawki w kolejnych pokoleniach i jest ona dziedziczona w kolejnych pokoleniach. Rośliny transgeniczne z sensowną wstawką ROKY1 były bardziej podatne na PVY, co oznacza, że transgen w orientacji antysensownej lepiej indukuje wyciszanie RNA wirusowego i w ten sposób nie dopuszcza do namnażania się patogenu. Innym wyjaśnieniem braku odporności przy obecności transgeny może być efekt pozycji, czyli miejsce włączenia wstawki (8). Jeżeli transgeny zostaną włączone w region euchromatyny, to na jego ekspresję mogą wpływać sekwencje regulatorowe sąsiednich genów gospodarza. Natomiast włączenie transgeny w region heterochromatyny, jak również wewnątrz lub w pobliżu powtarzających się sekwencji DNA powoduje jego inaktywację (75). Ważna jest również liczba kopii transgeny w tym samym miejscu integracji. Inaktywacji mogą podlegać transgeny, które integrują po 2 lub więcej sztuk do jednego miejsca na chromosomie, gdyż mogą tworzyć bezpośrednie lub odwrócone powtórzenia, co powoduje efekt wyciszenia (54, 75).

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

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

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

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

Podsumowanie

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

Literatura

1. A c o s t a - L e a l R., X i o n g Z.: Complementary functions of two recessive R-genes determine resistance durability of tobacco "Virgin A Mutant" (VAM) to Potato virus Y. *Virology*, 2008, **379**: 275-283.
2. A n o G., B l a n c a r d D., C a i l l e t a u B.: Mise au point sur la résistance recessive aux souches nécrotiques du virus Y de la pomme de terre (PVY) présente chez *Nicotiana tabacum*. *Ann. du Tabac*, 1995, **27**: 35-42.
3. B e r b e ć A., G ł a ż e w s k a Z.: Transfer of resistance to potato virus Y from *Nicotiana benavidesii* Goodspeed to *N. tabacum* L. *Genetica Polonica*, 1988, **29(3-4)**: 323-333.
4. B e r b e ć A., M a d e j A.: Obecna sytuacja i perspektywy uprawy tytoniu w Polsce na tle świata i Unii Europejskiej. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 2012, **31(5)**: 51-67.
5. B e r b e ć A.: Chromosome pairing and pollen fertility in the interspecific F₁ Hybrids *Nicotiana tabacum* L. x *N. benavidesii* Goodspeed, *N. knightiana* Goodspeed x *N. tabacum*, and *N. raimondii* Macbride x *N. tabacum*. *Genetica Polonica*, 1987, **28(3)**: 263-269.
6. B i s k u p J., C z o p W., D r a g o n J., D u d e k M., E c h t M., J a n k o w s k i F., K w i e c i ń s k i W., M a t u s i e w i c z E., P o n i e w i e r s k i F., R o m a n T., R ó ż a ń s k i J., S k i e n d z i e l e w s k i J., T r o j a n J., W ę g r z y n S., W i e r z b a M., W i r o w s k i Z.: Tytoń – uprawa, hodowla, fermentacja. PWRiL, Warszawa 1969.
7. B r o w n i n g K.S., B a i l e y - S e r r e s J.: Mechanism of cytoplasmic mRNA translation. *Arab. Book*, 2015, **13**: e 0176.
8. B r u m i n M., S t u k a l o v S., H a v i v S., M u r u g a n a n t h a m M., M o s k o v i t z Y., B a t u m a n O., F e n i g s t e i n A., M a w a s s i M.: Post-Transcriptional Gene Silencing and Virus Resistance in *Nicotiana benthamiana* Expressing a Grapevine Virus a Mini-Replicon. *Transgenic Research*, 2009, **18**: 331-345.
9. B u r k L.G., G o o d i n g G.V., C h a p l i n J.F.: Reaction of *Nicotiana* species and cultivars or breeding lines of *Nicotiana tabacum* to three strains of potato virus Y. *Tobacco Science*, 1982, **28**: 86-88.
10. C a m p b e l l K.G., W e r n s m a n E.A., F i t z m u r i c e W.P., B u r n s J.A.: Construction of designer chromosome in tobacco. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, **87**: 837-842.

11. Carr J.P., Zaitlin M.: Resistance in transgenic plants expressing a non-structural gene sequence of markedly reduced virus replication. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1991, **4**: 579-585.
12. Carstens H., Seehofer F.: How Virginia SCR is obtained and cultivated in the Federal Republic of Germany. *CORESTA*, **3**: 39-43.
13. Chrzanowska M.: Differentiation of potato virus Y (PVY) isolates. *Phytopathologia Polonica*, 1994, **8**: 15-20.
14. Cooper J.I., Jones A.T.: Responses of plants to viruses: proposals for the use of terms. *Phytopathology*, 1983, **73**: 127-128.
15. Crosslin J.M.: PVY: An Old Enemy and a Continuing Challenge. *American Journal of Potato Research*, 2013, **90**: 2-6.
16. Czarnek M., Bereta J.: System CRISPR-Cas – od odporności bakterii do inżynierii genomowej. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (online), 2016, **70**: 901-916.
17. Czubačka A., Doroszevska T.: Estimating agronomic traits of transgenic tobacco lines. *Euphytica*, 2010, **172**: 35-47.
18. Czubačka A., Doroszevska T.: Odporność transgeniczných linií tytoniu na vírus Y zemiňniaka (PVY). *Biotechnologia*, 2010, **2(89)**: 72-82.
19. Depta A., Doroszevska T., Czubačka A.: Resistance Response of the Recently Discovered Species *Nicotiana gluticola* to Potato virus Y (PVY) and Tomato spotted wilt virus (TSWV) Compared to Other Sources of Resistance. *Agronomy*, 2021, **11(8)**, 1617.
20. Depta A., Doroszevska T., Czubačka A.: Zróżnicowanie reakcji odpornościowej wybranych odmian tytoniu (*Nicotiana tabacum*) w zależności od użytego izolatu wirusa Y zemiňniaka (PVY). *Polish Journal of Agronomy*, 2020, **42**: 3-13.
21. Depta A., Doroszevska T.: Development and cytometric evaluation of interspecific F₁ hybrids *Nicotiana tabacum* x *N. africana*. *Polish Journal of Agronomy*, 2019, **38**: 3-14.
22. Diaz-Pendon J.A., Truniger V., Nieto C., Garcia-Mas J., Bendahmane A., Aranda M.A.: Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Molecular Plant Pathology*, 2004, **5(3)**: 223-233.
23. Dinant S., Blaise F., Kusiak C., Astier-Manifacer S., Albouy J.: Heterologous resistance to potato virus Y in transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of lettuce mosaic virus. *Phytopathology*, 1993, **83**: 818-824.
24. Dinant S., Kusiak C., Cailleteau B., Verrier J.L., Chupeau M.C., Chupeau Y., Le T.A.H., Delon R., Albouy J.: Field resistance against potato virus Y infection using natural and genetically engineered resistance genes. *European Journal of Plant Pathology*, 1998, **104**: 377-382.
25. Dlugé K.L., Song Z., Wang B., Steede W., Xiao B., Liu Y., Dewey R.E.: Characterization of *Nicotiana tabacum* genotypes possessing deletion mutations that affect potyvirus resistance and the production of trichome exudates. *BMC Genomics*, 2018, **19**, 484.
26. Doroszevska T., Berbeć A.: Cytogenetical investigations of polyploid interspecific hybrids of *Nicotiana africana* with different cultivars of *N. tabacum*. *Journal of Genetics & Breeding*, 2000, **54**: 77-82.
27. Doroszevska T., Berbeć A.: Chromosome pairing and microsporogenesis in interspecific F₁ hybrids of *Nicotiana africana* with different cultivars of *N. tabacum*. *Journal of Genetics & Breeding*, 1996, **50**: 75-82.
28. Doroszevska T., Czubačka A.: Ocena odporności odmian i linii hodowlanych tytoniu na wirusa Y zemiňniaka (PVY). *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 2008, **13**: 29-42.
29. Doroszevska T., Depta A., Czubačka A.: Album of *Nicotiana* species. Institute of Soil Science and Plant Cultivation. National Research Institute, Puławy, 2009, ss. 373.
30. Doroszevska T., Depta A.: Resistance of wild *Nicotiana* species to different PVY isolates. *Phytopathologia*, 2011, **59**: 9-24.

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

50. Lewis R.S.: Evaluation of *Nicotiana tabacum* genotypes possessing *Nicotiana africana*-derived genetic tolerance to *Potato Virus Y*. *Crop Science*, 2007, **47**: 1975-1984, doi: 10.2135/cropsci2007.01.0001.
51. Lewis R.S.: Transfer of resistance to potato virus Y (PVY) from *Nicotiana africana* to *Nicotiana tabacum*: possible influence of tissue culture on the rate of introgression. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, **110**: 678-687, doi: 10.1007/s00122-004-1893-4.
52. Lucas G.B., Gooding G.V., Sasser J.N., Gerstel D.U.: Reaction of *Nicotiana africana* to black shank, Granville wilt, tobacco mosaic virus and potato virus Y. *Tobacco Science*, 1980, **24**: 141-142.
53. Masuta C., Nishimura M., Morishita H., Hataya T.: A single amino acid change in viral genome-associated protein of potato virus Y correlates with resistance breaking in 'Virgin A Mutant' tobacco. *Phytopathology*, 1999, **89**: 118-123.
54. Matzke M.A., Birchler J.A.: RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nature*, 2005, **6**: 24-35.
55. Merxmüller H., Buttler L.P.: *Nicotiana* in der Anfrikanischen Namib-Ein Pflanzen geographisches und phylogenetisches, 1975 Ratsel. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München*, **12**: 91-104.
56. Michel V., Julio E., Candresse T., Cotucheau J., Decorps C., Volpatti R., Moury B., Glais L., Dorlhac de Borne F., Decroocq V., German-Retana S.: *NTPN1*: a RPP8-like *R* gene required for Potato virus Y-induced veinal necrosis in tobacco. *The Plant Journal*, 2018, **95**: 700-714.
57. Michel V., Julio E., Candresse T., Cotucheau J., Decorps C., Volpatti R., Moury B., Glais L., Jacquot E., Dorlhac de Borne F., Decroocq V., Gallois J.L., German-Ratana S.: A complex eIF4E locus impacts the durability of *va* resistance to Potato virus Y in tobacco. *Molecular Plant Pathology*, 2019, **20**(8): 1051-1066.
58. Miller R.D.: Registration of 'TN86' burley tobacco. *Crop Science*, 1987, **27**: 365-366.
59. Noguchi S., Tajima T., Yamamoto Y., Kubo T.: Identification of RAPD markers linked to potato virus Y resistance gene in tobacco. *Bull. Spec. CORESTA Congress, Yokohama*, 1996, p. 160, P9.
60. Noguchi S., Tajima T., Yamamoto Y., Ohno T., Kubo T.: Deletion of a large genomic segment in tobacco varieties that are resistant to potato virus Y. *Molecular Genetics and Genomics*, 1999, **262**: 822-829.
61. Orlikowska T.: Transformacja roślin za pomocą wektorów *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnologia*, 1994, **1**(24): 32-43.
62. Palukaitis P., Carr J.P.: Plant resistant responses to viruses. *Journal of Plant Pathology*, 2008, **90** (2): 153-171.
63. Park E.K., Kim Y.H., Paek H., Chae S.Y., Kang S.W.: Characteristics of resistance to potato virus Y in transgenic tobacco plants mediated with complementary DNA (cDNA) of PVY replicase genes. *Bull. Spec. CORESTA Congress, Yokohama*, 1996, p. 162, P11.
64. Powell-Abel P., Nelson R.S., Barun De, Hoffmann N., Rogers S.G., Fraley R.T., Beachy R.N.: Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 1986, **232**: 738-743.
65. Przybyś M., Doroszevska T., Berbeć A.: Point mutation in the Viral genome-linked protein (VPg) of Potato virus Y probably correspond with ability to overcome resistance of tobacco. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 2013, **11** (3&4): 986-989.
66. Robaglia C., Caranta C.: Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science*, 2006, **11**(1): 40-45.
67. Robaglia C., Durand-Tardif M., Tronchet M., Boudazin G., Astier-Manificier S., Casse-Delbart F.: Nucleotide Sequence of Potato Virus Y (N Strain) Genomic RNA. *Journal of General Virology*, 1989, **70**: 35-947.

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

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

Adres do korespondencji:

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

AUTOR
Anna Depta

ORCID
0000-0001-7578-5197