



INSTYTUT UPRAWY NAWOŻENIA I GLEBOZNAWSTWA
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

Rozprawa doktorska
mgr Monika Agacka-Mołdoch

**Żywotność nasion tytoniu w zależności od warunków
przechowywania i mapowanie QTL kontrolujących tę cechę**

Rozprawa doktorska wykonana
w Zakładzie Biotechnologii i Hodowli Roślin
Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowego Instytut Badawczego
w Puławach

Promotor: prof. dr hab. Teresa Doroszevska

Promotor pomocniczy: dr Anna Czubačka

Puławy 2024

Podziękowania

Serdecznie dziękuję Pani prof. dr hab. Teresie Doroszewskiej za nieocenioną pomoc, merytoryczne wsparcie, udzielanie cennych wskazówek oraz cierpliwość okazaną podczas pisania pracy doktorskiej.

Dziękuję również Pani dr Annie Czubackiej za poświęcony czas i pomoc podczas pisania pracy doktorskiej.

I would like to express my sincere gratitude to prof. dr hab. Andreas Börner for the fruitful collaboration and his unwavering support and belief in me.

Dziękuję współautorom artykułów za możliwość współpracy i pomoc w realizacji badań.

Chciałabym również podziękować mojej rodzinie i przyjaciołom za wsparcie emocjonalne w trakcie całej mojej pracy nad doktoratem.

Spis treści

1. Spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	5
2. Wstęp.....	6
3. Hipoteza i cel badań.....	9
4. Przegląd literatury.....	10
4.1. Rola i utrzymanie roślinnych zasobów genowych.....	10
4.2. Zasoby genowe rodzaju <i>Nicotiana</i>	13
4.3. Żywotność i wigor nasion.....	17
4.4. Długość życia nasion w zależności od warunków przechowywania.....	19
4.5. Identyfikacja QTL.....	22
5. Materiał i metody badawcze.....	28
5.1. Materiał badawczy.....	28
5.1.1. Materiał w badaniach dotyczących oceny żywotności nasion	28
5.1.2. Materiał badawczy wykorzystany do identyfikacji QTL warunkujących żywotność nasion <i>Nicotiana tabacum</i>	30
5.2. Metody badawcze.....	31
5.2.1. Test kiełkowania.....	31
5.2.2. Test kontrolowanego starzenia.....	32
5.2.3. Szybkość kiełkowania.....	33
5.2.4. Identyfikacja QTL dla cech związanych z długością życia nasion	34
6. Wyniki badań.....	36
6.1. Wpływ warunków przechowywania na żywotność nasion obiektów z rodzaju <i>Nicotiana</i>	36
6.1.1. Porównanie żywotności nasion tytoniu przechowywanych w warunkach niepodlegających ścisłej kontroli oraz w warunkach kontrolowanej temperatury i wilgotności względnej powietrza	36
6.1.2. Porównanie żywotności nasion tytoniu przechowywanych w temperaturze 0°C i -18°C	37
6.2. Identyfikacja QTL dla cech związanych z długością życia nasion	40
6.2.1. Charakterystyka fenotypowa populacji RIL Florida 301 × Hicks.....	40
6.2.2. Identyfikacja QTL w populacji RIL Florida 301 × Hicks dla cech związanych z żywotnością nasion.....	42
6.2.3. Charakterystyka fenotypowa populacji DH Beinhart-1000 × Hicks.....	45

6.2.4. Identyfikacja QTL w populacji DH Beinhart–1000 × Hicks dla cech związanych z żywotnością nasion	46
7. Dyskusja.....	50
8. Podsumowanie i wnioski.....	59
9. Literatura.....	61
10. Wykaz rysunków i tabel.....	75
11. Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim.....	78
12. Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku angielskim.....	81
13. Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	84
Agacka M., Depta A., Börner M., Doroszevska T., Hay F.R., Börner A. 2013. Viability of <i>Nicotiana</i> spp. seeds stored under ambient temperature. Seed Science and Technology, 41:474–478; doi: 10.15258/sst.2013.41.3.15 Agacka M., Laskowska D., Doroszevska T., Hay F.R., Börner A. 2014. Longevity of <i>Nicotiana</i> seeds conserved at low temperatures in ex situ genebanks. Seed Science and Technology, 42:355–362, doi: 10.15258/sst.2014.42.3.05 Agacka-Mołodoch M., Nagel M., Doroszevska T., Lewis R. S., Börner A., 2015. Mapping quantitative trait loci determining seed longevity in tobacco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.). Euphytica, 202: 479, doi: 10.1007/s10681-015-1355-x Agacka-Mołodoch M., Rehman Arif M.A., Lohwasser U., Doroszevska T., Lewis R.M., Börner A. 2021. QTL analysis of seed germination traits in tobacco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.). Journal of Applied Genetics, 62:441-444, doi:10.1007/s13353-021-006236	
14. Oświadczenie doktoranta i współautorów dotyczące wkładu w przygotowanie publikacji...110	
15. Oświadczenie promotora, promotora pomocniczego i autora rozprawy doktorskiej.....121	

1. Spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Publikacja	IF zgodny z rokiem publikacji	5-letni IF czasopisma	Punktacja MNiSW przed 31.07.2019	Punktacja MNiSW po 31.07.2019	Wkład doktoranta w publikację
Agacka M., Depta A., Börner M., Doroszevska T., Hay F.R., Börner A., (2013), Viability of <i>Nicotiana</i> spp. seeds stored under ambient temperature. Seed Science and Technology, 41:474–478 doi: 10.15258/sst.2013.41.3.15	0,89	0,59	20	40	65%
Agacka M., Laskowska D., Doroszevska T., Hay FR., Börner A., (2014), Longevity of <i>Nicotiana</i> seeds conserved at low temperatures in ex situ genebanks. Seed Science and Technology, 42:355–362 doi: 10.15258/sst.2014.42.3.05	0,61	0,59	20	40	70%
Agacka-Moldoch M., Nagel M., Doroszevska T., Lewis R. S., Börner A., (2015), Mapping quantitative trait loci determining seed longevity in tobacco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.). Euphytica, 202: 479 doi: 10.1007/s10681-015-1355-x	1,89	2,18	30	70	65%
Agacka-Moldoch M., Rehman Arif M.A., Lohwasser U., Doroszevska T., Lewis R.M., Börner A. (2021), QTL analysis of seed germination traits in tobacco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.). Journal of Applied Genetics, 62:441-444 doi: 10.1007/s13353-021-00623-6	3,24	2,76	20	140	65%
Suma	5,34	6,12	90	290	-

2. Wstęp

Niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych, zgodnie z Ustawą prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. z 2023 r. poz. 742) oraz Regulaminami Rady Naukowej IUNG-PIB (Uchwała nr 13/2018 z dnia 27 marca 2018 r. oraz Uchwała nr 86/2019 z dnia 18 września 2019 r.). W skład rozprawy doktorskiej wchodzi cztery artykuły naukowe. Sumaryczny Impact Factor publikacji stanowiących zbiór artykułów według roku publikacji wynosił 5,34, a suma IF z 5-lecia wynosiła 6,12. Liczba punktów wg wykazu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) sprzed 2019 roku wynosiła 90, a wg wykazu z 2019 roku 290 punktów. Artykuły zostały załączone na końcu niniejszej rozprawy jako rozdział 13.

Prace stanowiące rozprawę doktorską dotyczą żywotności nasion obiektów kolekcji z rodzaju *Nicotiana* przechowywanych w zróżnicowanej temperaturze w różnych bankach genów oraz identyfikacji regionów genetycznych powiązanych z żywotnością nasion.

Ochrona roślinnych zasobów genowych obejmuje ochronę różnorodności genetycznej zapewniającą przystosowanie roślin do zmieniających się warunków środowiska. Najskuteczniejszym sposobem, poza ochroną w miejscu pochodzenia (*in situ*), jest przechowywanie nasion w bankach genów wraz z zapewnieniem ich dostępności (Nadarajan i in., 2023). Toteż niezwykle ważne jest poznanie okresu, w którym nasiona pozostają żywotne, z uwzględnieniem sposobu ich przechowywania. Wiedza ta jest bardzo przydatna bankom genów, firmom nasiennym jak też rolnikom. Wilgotność nasion i temperatura przechowywania są krytycznymi czynnikami wpływającymi na ich żywotność. Nasiona, które tolerują suszenie do bardzo niskiej wilgotności, mogą być przechowywane długoterminowo w bankach genów w niskiej temperaturze (od -20°C do +4°C) (Rao i in., 2006). Żywotność nasion określana przez okres, w którym mogą one zachować odpowiednią zdolność kiełkowania, jest cechą ilościową warunkowaną wieloma genami. Jest to cecha bezpośrednio związana z procesem starzenia się nasion i wynika ze zmian genetycznych, fizjologicznych, fizykochemicznych, cytologicznych i molekularnych zachodzących w nasionach (Sano i in., 2015; Solberg i in., 2020). W wyniku tych zmian dochodzi do obniżenia wigoru, zdolności kiełkowania, a w konsekwencji do utraty żywotności.

Poza wilgotnością i temperaturą powietrza istotną rolę mającą wpływ na proces starzenia się nasion odgrywają czynniki wewnętrzne, w szczególności struktura i skład chemiczny (Pirredda i in., 2023). Są to cechy specyficzne dla poszczególnych gatunków roślin, toteż opracowanie nieinwazyjnych i szybkich metod oceny żywotności nasion przechowywanych w różnych warunkach, w tym w bankach genów, jest przedmiotem wielu badań (Xia i in., 2019). Kluczową rolę w monitorowaniu żywotności nasion spełnia nadal test zdolności kiełkowania. Zwykle na jego podstawie podejmowana jest decyzja o regeneracji obiektu (Fu i in., 2015; Nadarajan i in., 2023). Monitorowanie żywotności obiektów utrzymywanych w bankach genów jest pracochłonne i czasochłonne. Dlatego informacja o tym jak długo dany gatunek czy odmiana zachowuje żywotność, pozwala ograniczyć ilość wykonywanych testów kiełkowania i wydłużyć okres pomiędzy regeneracjami. Wiadomym jest, iż gatunki, a nawet odmiany przechowywane w identycznych warunkach różnią się znacząco pod względem zachowania żywotności. Coraz częściej prowadzone są badania, których celem jest identyfikacja regionów genetycznych związanych z żywotnością nasion. Do identyfikacji regionów genetycznych związanych z cechami ilościowymi, w tym z żywotnością nasion, wykorzystywane jest m.in. mapowanie QTL (ang. Quantitative Trait Loci). Zastosowanie tej metody dostarcza cennych informacji mogących stanowić wsparcie w zarządzaniu regeneracją obiektów utrzymywanych w bankach genów. Jest również pomocne w wyborze odpowiednich genotypów do hodowli nowych odmian o przedłużonej żywotności nasion (Arif i in., 2022).

Kolekcja rodzaju *Nicotiana*, będąca przedmiotem badań przedstawionych w niniejszej pracy, stanowi cenny materiał pod względem różnorodności genetycznej. Zróżnicowanie genetyczne rodzaju *Nicotiana* ma swoje źródło w rozmieszczeniu geograficznym i widoczne jest pod względem cytogenetycznym i fenotypowym. Z uwagi na pochodzenie rodzaju *Nicotiana*, jak też rozpowszechnioną uprawę gatunku *Nicotiana tabacum* (tytoniu szlachetnego) na niemal wszystkich kontynentach, zasoby genowe gromadzone są w wielu kolekcjach. Są one bardzo zróżnicowane pod względem liczebności jak również pod względem dostępności, bowiem wiele kolekcji stanowi prywatną własność (Lewis, 2021). Największa kolekcja *Nicotiana* znajduje się w Chińskiej Akademii Nauk Rolniczych (TRI, The Tobacco Research Institute) (Tobacco Research Institute of the Chinese, 2016). W USA bardzo duża kolekcja gromadząca zasoby genowe rodzaju *Nicotiana* znajduje się w Oksfordzie w Północnej Karolinie oraz na Uniwersytecie w Kentucky. W Europie największa kolekcja tego rodzaju znajdowała

się w Instytucie Tytoniowym w Bergerac we Francji, którego spadkobiercą jest firma Bergerac Seed & Breeding. W Niemczech kolekcja rodzaju *Nicotiana* prowadzona jest przez firmę NiCoTa, natomiast inna znajduje się w największym banku genów w Europie w IPK w Gatersleben <https://gbis.ipkgatersleben.de/gbis2i/faces/index.jsf>.

W Polsce gromadzenie zasobów genowych rodzaju *Nicotiana* rozpoczął sto lat temu prof. Lucjan Kaznowski w ówczesnym Państwowym Instytucie Naukowym Gospodarstwa Wiejskiego w Puławach. Prowadzona obecnie kolekcja w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa–Państwowym Instytucie Badawczym jest największą w Polsce i jedną z większych w Europie i na świecie. Nasiona obiektów kolekcyjnych zdeponowane są w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych mieszczącym się w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowym Instytucie Badawczym w Radzikowie.

Zasoby genowe *Nicotiana* są przedmiotem licznych badań dotyczących pochodzenia i rozmieszczenia gatunków, liczby chromosomów, krzyżowalności, zawartości związków chemicznych, czy odporności na czynniki biotyczne i abiotyczne (Lewis, 2020). Zdecydowanie mniej prac poświęcono problematyce żywotności nasion. Żywotność nasion tytoniu, podobnie jak innych gatunków, w dużej mierze zależy od warunków przechowywania. Wysoka temperatura powietrza, zwłaszcza podlegająca okresowym wahaniom, podobnie jak wysoka wilgotność względna czy stały dopływ tlenu są czynnikami ograniczającymi żywotność.

Podjęte badania obejmowały problematykę żywotności nasion dwóch gatunków *N. tabacum* i *N. rustica*, przechowywanych w zróżnicowanych warunkach oraz określenia genetycznych podstaw determinujących ich żywotność.

3. Hipoteza i cel badań

Hipoteza badawcza zakładała zróżnicowanie żywotności nasion wybranych gatunków rodzaju *Nicotiana* w zależności od warunków przechowywania oraz od czynników genetycznych.

Celem pracy była ocena żywotności nasion obiektów *Nicotiana tabacum* i *Nicotiana rustica* przechowywanych w zróżnicowanych warunkach oraz identyfikacja regionów genetycznych (QTL) warunkujących długość życia nasion tytoniu.

Cele szczegółowe obejmowały:

1. Ocenę żywotności nasion przechowywanych przez okres 2–39 lat w zróżnicowanych warunkach temperatury i wilgotności w bankach genów IPK w Niemczech, IHAR-PIB w Radzikowie oraz w IUNG-PIB w Puławach.
2. Identyfikację regionów genetycznych (QTL) warunkujących żywotność nasion z wykorzystaniem dwóch populacji mapujących.

4. Przegląd Literatury

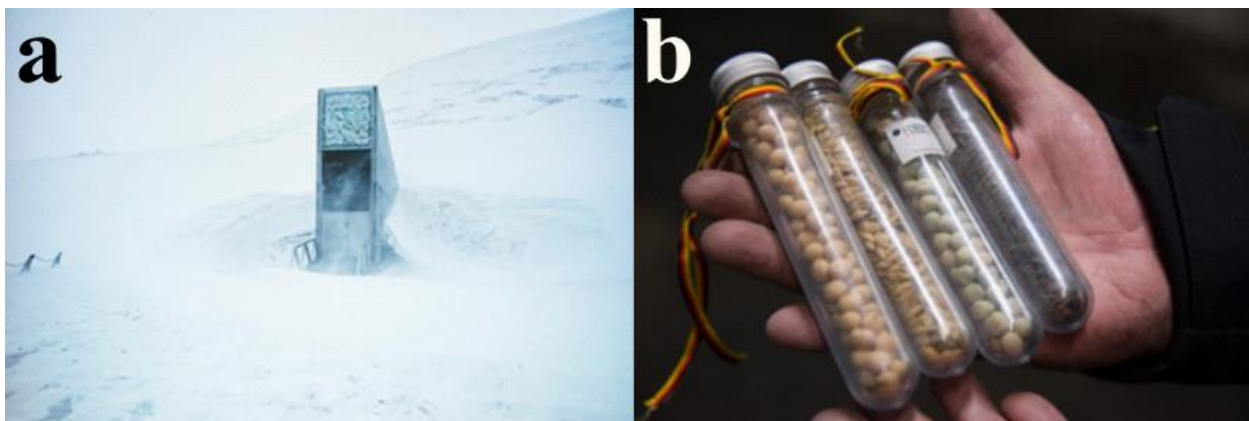
Rola i utrzymanie roślinnych zasobów genowych

Zasoby genowe roślin, określane też często jako plazma zarodkowa (ang. germplasm), mają szczególne znaczenie dla zachowania różnorodności w środowisku przyrodniczym, zwłaszcza w okresie szybkiego rozwoju cywilizacji. Stanowią swojego rodzaju dziedzictwo naturalne wobec zmniejszającej się systematycznie liczby gatunków występujących w świecie. Niezwykle istotne jest strategiczne znaczenie dla zrównoważonej produkcji rolnej. Różnorodność genetyczna roślin stanowi podstawę dla przystosowania rolnictwa do zmian, w tym do postępujących zmian klimatu (susze, powodzie czy inne niekorzystne zjawiska pogodowe), zniszczeń w wyniku katastrof, jak też przemian wynikających ze zmieniających się warunków społeczno-gospodarczych np. urbanizacji i industrializacji. Uwzględniając te kwestie, ochrona zasobów genowych roślin staje się obowiązkiem wielu instytucji jak też całego społeczeństwa. W konwencji o różnorodności biologicznej roślinne zasoby genowe są zdefiniowane jako materiał genetyczny posiadający nie tylko faktyczną, ale i potencjalną wartość dla wyżywienia i rolnictwa (FAO, 2007; Gryziak, 2016). Z wykorzystaniem istniejących już form uprawnych oraz gatunków pokrewnych prowadzone są systematycznie prace hodowlane mające na celu poprawę cech odpornościowych i jakościowych. Zasoby genowe stanowią zatem ogromny potencjał w tworzeniu nowych odmian wzbogaconych o cenne cechy użytkowe, co przekłada się na korzyści ekonomiczne i środowiskowe. Wykorzystanie odporności na choroby i szkodniki daje możliwość ograniczenia stosowania środków ochrony roślin (Gefferesa, 2023; Sosnowska, 2016; Deng, 2020). Z kolei wzrost zawartości pożądaných metabolitów w roślinach może skutkować oszczędnościami w procesie przetwórstwa (Abewoy, 2017; Gryziak, 2016). Ochronę i zrównoważone wykorzystanie roślinnych zasobów genowych w rolnictwie regulują międzynarodowe akty prawne: Konwencja o Różnorodności Biologicznej (CBD) „Szczyt Ziemi” z Rio de Janeiro podpisana w 1992 roku przez 192 państwa należące do ONZ, Międzynarodowy Traktat o zasobach genetycznych roślin dla wyżywienia i rolnictwa (ITPRFA, 2004) oraz 2. Globalny Plan Działań dla Ochrony i Zrównoważonego Wykorzystania Roślinnych Zasobów Genetycznych dla Wyżywienia i Rolnictwa (GPA, 2011) (Podyma, 2000; Kotlińska i Świącicki, 2004; Czembor i in., 2017).

Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) szacuje, że około 7,4 miliona obiektów utrzymywanych jest w kolekcjach w 1750 bankach genów na całym świecie. Banki genów gromadzą materiał roślinny, długotrwale go przechowują w stanie czystości genetycznej i w stanie żywym. Chronią także przed tzw. erozją genetyczną prowadzącą do zawężenia bioróżnorodności. Zadaniem banku genów jest również charakterystyka zgromadzonych obiektów pod względem cech przydatnych w tworzeniu postępu biologicznego (np. odporności na stresy biotyczne czy abiotyczne) oraz udostępnianie obiektów kolekcyjnych dla potrzeb nauki i hodowli (Gryziak, 2020; Salgotra i in., 2023). Według danych FAO największym (pod względem wielkości zbiorów) bankiem genów w Unii Europejskiej jest bank w Niemczech znajdujący się w Gatersleben Leibniz – Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK, z niem. Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung), w którym przechowywanych jest około 151 000 obiektów. Drugim, co do wielkości zbiorów, jest Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych (KCRZG), znajdujące się w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowym Instytucie Badawczym (IHAR-PIB) w Radzikowie, gdzie zdeponowano około 76 000 obiektów roślin rolniczych (Czembor, 2017). W obydwu tych bankach genów utrzymywane są kolekcje rodzaju *Nicotiana*.

Należy podkreślić, że ponad 90% obiektów w kolekcjach jest przechowywanych w postaci nasion, dlatego też głównym zadaniem banków genów jest utrzymywanie ich w stanie żywym. Zastosowanie niskiej temperatury i niskiej wilgotności powietrza pozwala na wydłużenie żywotności nasion. Dzięki temu możliwe jest zmniejszenie częstotliwości regeneracji obiektów, co nie tylko obniża ryzyko utraty pożądanej zmienności i czystości genetycznej, ale także redukuje koszty utrzymania kolekcji. Nasiona typu orthodox, znoszące wysoki stopień odwodnienia/wysuszenia, mogą być rutynowo przechowywane w temperaturze -18°C . Takie warunki pozwalają znacznie wydłużyć czas przechowywania nasion bez konieczności regeneracji. Jednak nawet przy zachowaniu najwyższych standardów, nasiona z czasem ulegają procesom starzenia i muszą być regenerowane (Walters i Pence, 2021). Postępowanie z obiektami zgromadzonymi w bankach genów określają międzynarodowe standardy. Dotyczą one m.in. suszenia i przechowywania nasion, monitorowania ich żywotności w trakcie przechowywania, a także regeneracji, charakterystyki, oceny, dokumentacji i dystrybucji obiektów kolekcyjnych (FAO, 2010). Wskazane jest, aby nasiona każdego obiektu

były przechowywane w dwóch rodzajach kolekcji (Chojnowski, 2022; Czembor i in., 2017). Pierwsza to kolekcja podstawowa – rezerwa banku genów. Nasiona z kolekcji podstawowej przeznaczone są do przechowywania długoterminowego, nie są przeznaczone do dystrybucji. W tym celu nasiona pakowane są w szczelne pojemniki, nieprzepuszczalne dla pary wodnej i tlenu, wykonane ze szkła, metalu lub folii aluminiowej, a następnie przechowywane w temperaturze -18°C (Chojnowski i in., 2022; Czembor i in., 2017; Michałowska i Białoskórska, 2022). Kolekcja aktywna obejmuje nasiona przeznaczone do prowadzenia badań oraz do ewentualnego przekazania zainteresowanym odbiorcom: hodowcom, naukowcom, rolnikom. Według zaleceń FAO (FAO, 2014) nasiona kolekcji aktywnej mogą być przechowywane w temperaturze $5\text{--}10^{\circ}\text{C}$ i wilgotności względnej $15 \pm 3\%$. Jednak obecnie zaleca się, aby kolekcja aktywna była przechowywana, podobnie jak podstawowa, w temperaturze -18°C (Chojnowski i in., 2022). Na wypadek utraty nasion zdeponowanych w narodowych bankach genów, dodatkowym zabezpieczeniem cennego materiału genetycznego są tzw. bezpieczne duplikaty. Wskazane jest, aby były one zdeponowane w miejscu oddalonym od banku genów, w którym przechowywane są oryginalne próbki, a ilość nasion przeznaczona do przechowania jako bezpieczny duplikat powinna pozwolić na odtworzenie danego obiektu w przypadku jego utraty w macierzystym banku genów. Bezpieczne duplikaty nasion roślin uprawnych mogą być przekazywane do Globalnego Banku Nasion (Svalbard Global Seed Vault) zlokalizowanego na Svalbardzie (Spitsbergen) (<https://www.croptrust.org/work/svalbard-global-seed-vault>). Obecnie w Globalnym Banku Nasion znajdują się duplikaty 1,3 miliona próbek nasion gatunków roślin uprawnych z niemal każdego kraju na świecie. Bank może pomieścić nawet 4,5 miliona próbek. Wieczna zmarzlina i skały zapewniają warunki, w których próbki nasion pozostaną bezpieczne w temperaturze ujemnej nawet bez zewnętrznego zasilania. Dzięki temu przetrwają katastrofy zarówno te naturalne jak i te, które mogą wystąpić w wyniku działalności człowieka.



Rysunek 1. a). Globalny Bank Nasion na Svalbardzie, b). Nasiona przechowywane w Globalnym Banku Nasion na Svalbardzie. Zdjęcia: Norwegian Ministry for Agriculture and Food;
 Źródło: <https://halospitsbergen.pl/ochrona-zasobow-genetycznych-jest-rownie-wazna-dla-wszystkich-krajow-biolog-asmund-asdal-o-globalnym-banku-nasion-na-svalbardzie/>

Globalny Bank Nasion na Svalbardzie powstał w 2008 roku. Umowę na przekazywanie nasion z KCRZG w Radzikowie do Globalnego Banku Nasion podpisano w 2019 roku. Pierwszy polski depozyt obejmował historyczne krajowe odmiany roślin uprawnych oraz obiekty pozyskane z ekspedycji terenowych, które stanowią dziedzictwo narodowe.

4.1. Zasoby genowe rodzaju *Nicotiana*

Wszystkie zagadnienia dotyczące roli, utrzymywania i znaczenia roślinnych zasobów dotyczą również obiektów rodzaju *Nicotiana*. Należy podkreślić, że kolekcje rodzaju *Nicotiana* zajmują istotne miejsce w wielu bankach genów zlokalizowanych w różnych krajach. Polska kolekcja zajmuje pod tym względem znaczącą pozycję (tab.1).

Tabela 1. Największe kolekcje rodzaju *Nicotiana* na świecie w 2010 roku wg *FAO

Bank genów	Liczba obiektów
Institute of Crop Germplasm Resources, Chiny	3407
Central Tobacco Research Institute, Indie	2550
Oxford Tobacco Research Station (Tob), USA	2108
Research Unit For Alternative Crops To Tobacco, Włochy	1711
Australian Tropical Crops & Forages Genetic Resources Centre, Australia	948
IUNG-PIB, Puławy, Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin, Polska	**908
Instituto de Investigaciones del Tabaco, Kuba	780
Aegean Agricultural Research Institute, National Seed Gene Bank, Turcja	638
Crimean Tobacco Experimental Station, Ukraina	612
Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Niemcy	590
Inne jednostki (60)	8053
Suma	21715

* The Second Report on State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture, 2010.

** W wykazie z 2010 r. nie uwzględniono stabilnych linii hodowlanych, form tetraploidalnych i innych, zdeponowanych w kolekcji w latach późniejszych, niektóre z nich obecnie znajdują się tylko w kolekcji roboczej IUNG-PIB.

W Polsce obiekty kolekcji rodzaju *Nicotiana* przechowywane są w postaci nasion w przechowalni średnioterminowej (0°C) w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych mieszczącym się w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowym Instytucie Badawczym w Radzikowie (Czembor, 2017). Ponadto kolekcja aktywna przechowywana jest w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – PIB w Puławach w szafach nasiennych w temperaturze 4°C (do 2015 r. w temperaturze pokojowej) (Czubacka, 2022; Depta i Doroszevska, 2023). W IUNG-PIB zasoby kolekcyjne są waloryzowane, przechowywane jako duplikaty i w miarę potrzeb, regenerowane (Czubacka, 2022). Będąca również przedmiotem badań kolekcja rodzaju *Nicotiana* znajdująca się w Niemczech w Gatersleben Leibniz – Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research przechowywana jest w temperaturze 20,3±2,3°C oraz długoterminowo w temperaturze -18°C. Zastosowanie różnej temperatury przechowywania kolekcji wynika z możliwości technicznych poszczególnych placówek naukowych. Kolekcja rodzaju *Nicotiana* zgromadzona w Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research liczy 590 obiektów, z których 355 należy

do *N. tabacum*, 112 do *N. rustica*, a 123 stanowią gatunki dzikie rodzaju *Nicotiana*. Odpowiednie przechowywanie kolekcji oraz wiedza na temat zgromadzonych zasobów nie tylko zabezpiecza je przed utratą żywotności, ale pozwala na wykorzystanie dostępnej różnorodności genetycznej w pracach hodowlanych, jak również podczas prowadzenia wielu badań podstawowych.

Gatunki z rodzaju *Nicotiana* wykorzystywane są w hodowli międzygatunkowej, będąc źródłem odporności na choroby, czy źródłem cytoplazmatycznej męskiej sterility (Berbeć i Trojak-Goluch, 2001; Berbeć i Laskowska, 2005; Laskowska i Berbeć, 2007; Berbeć i Doroszevska, 1992). Często wykorzystywane są jako rośliny modelowe w badaniach fitopatologicznych (Bui i in., 1992) i w transformacji genetycznej u roślin wyższych (Baulcombe, 1999; Lewis, 2011).

Kolekcja rodzaju *Nicotiana* zgromadzona w Zakładzie Biotechnologii i Hodowli Roślin IUNG-PIB w Puławach jest jedną z najstarszych (tab.1). Twórcą polskiej kolekcji odmian i dzikich gatunków tytoniu był Profesor Lucjan Kaznowski, który już w latach dwudziestych ubiegłego wieku rozpoczął gromadzenie pierwszych obiektów rodzaju *Nicotiana* na potrzeby hodowli. W kolejnych latach kolekcja była systematycznie uzupełniana (Czubacka, 2022). Obecnie zawiera 1008 obiektów pochodzących z różnych rejonów świata, w tym 780 odmian tytoniu szlachetnego (*Nicotiana tabacum* L.), 83 odmian machorki (*Nicotiana rustica* L.) oraz 145 obiektów należących do dzikich gatunków *Nicotiana*, form poliploidalnych i cennych linii hodowlanych. Obiekty kolekcyjne zostały zgromadzone dzięki wymianie nasion z wieloma placówkami naukowymi z ponad 30 krajów. Znaczna część, nieco ponad 31%, zwłaszcza odmian *N. tabacum*, pochodzi z polskich ośrodków hodowlanych (Laskowska, 2007). Odmiany i linie hodowlane *N. tabacum* stanowią materiał genetyczny o dużej różnorodności, reprezentujący wszystkie znane typy użytkowe tytoniu. Szeroki zasięg geograficzny reprezentują dzikie gatunki *Nicotiana* pochodzące z Ameryki Północnej i Południowej, Australii, wysp Pacyfiku oraz Afryki. Charakteryzuje je bardzo duże zróżnicowanie pod względem cech morfologicznych, liczby chromosomów, składu chemicznego, odporności na choroby (Doroszevska i in., 2009). Toteż obiekty rodzaju *Nicotiana* zgromadzone w banku genów są systematycznie charakteryzowane zarówno pod względem morfologicznym, genetycznym, jak i też odporności na choroby wirusowe oraz grzybowe

(Doroszewska i in., 2009). Pozwala to na ich efektywne wykorzystywanie w hodowli odpornościowej tytoniu (Depta i in., 2023; Berbeć i Doroszewska, 2020).

Wiele gatunków z rodzaju *Nicotiana* jest cennym źródłem genetycznej odporności na wirusy, m.in. wirusa Y ziemniaka (potato virus Y, PVY) (Depta i in., 2020; Doroszewska i Depta, 2011; Czubaćka i in., 2020; Doroszewska i Czubaćka, 2008; Korbecka-Glinka i in., 2017), wirusa brązowej plamistości pomidora na tytoniu (tomato spotted wilt virus, TSWV) (Laskowska i Berbeć, 2006; Laskowska i in., 2013; Depta i in., 2021), wirusa mozaiki tytoniu (tobacco mosaic virus, TMV) (Depta i in., 2018). Obiekty z rodzaju *Nicotiana* zostały również przebadane pod kątem odporności na najważniejszą chorobę grzybową występującą w Polsce, czarną zgniliznę korzeni powodowaną przez patogen *Berkeleyomyces basicola* (dawniej *Thielaviopsis basicola*) (Berbeć i Trojak-Goluch, 2001; Doroszewska i Przybyś, 2007). Obiekty wykazujące odporność na choroby są szeroko wykorzystywane w hodowli tytoniu prowadzonej w IUNG-PIB w Puławach. W wyniku prac hodowlanych przeniesiono odporność na wirusa Y ziemniaka z dzikiego gatunku *N. africana* do tytoniu uprawnego odmiany BP-210 (Doroszewska, 2010) uzyskując linie tolerancyjne na najbardziej zjadliwe szczepy tego wirusa. *Nicotiana alata* została wykorzystana, jako źródło odporności na brązową plamistość pomidora i otrzymano cenne linie hodowlane (Laskowska i Berbeć, 2006; Korbecka-Glinka, 2019). Odporność na czarną zgniliznę korzeni z sukcesem została przeniesiona z gatunków *Nicotiana debneyi* i *Nicotiana glauca* do tytoniu uprawnego. W wyniku tych prac uzyskano nowe odporne odmiany (VRG 1, VRG 2, VRG 4, HTR 2, HTR 3, VRG 5TL, Wigola) (Berbeć, 2006; Berbeć, 2007; Trojak-Goluch, 2014). Przedstawione przykłady wykorzystania źródeł odporności wskazują jak ważne są zasoby genowe i jak istotne są odpowiednie warunki ich przechowywania.

W niniejszej pracy porównano żywotność wybranych zasobów genowych rodzaju *Nicotiana* znajdujących się w polskim banku genów z zasobami zgromadzonymi w niemieckim banku, z uwzględnieniem różnych warunków przechowywania.

4.2. Żywotność i wigor nasion

Czynnikami wpływającymi na potencjał fizjologiczny nasion jest żywotność i wigor, które regulują zdolność nasion do wyrażania swoich funkcji życiowych zarówno w korzystnych, jak i w niekorzystnych warunkach środowiskowych (Marcos-Filho, 2015).

Zalecaną metodą oceny jakości nasion w banku genów jest test kiełkowania, ponieważ jest to dokładna i niezawodna metoda (Fu i in., 2015). Jest on rekomendowany przez ISTA (ang. International Seed Testing Association) oraz FAO i jest powszechnie stosowany. Wolniejsze kiełkowanie i wzrastający udział nasion nieprawidłowo kiełkujących są objawami starzenia się nasion (Roberts, 1972; Walters i in., 2005; Sano i in., 2016). Wigor nasion definiowany jest przez ISTA jako suma tych właściwości nasion, które określają poziom aktywności i zachowania się nasion podczas kiełkowania i wschodów siewek w szerokim zakresie warunków środowiska. A zatem nie jest to pojedyncza mierzalna właściwość, lecz pojęcie związane z jakością nasion, które obejmuje: szybkość i równomierność kiełkowania nasion i wzrostu siewek, zdolność nasion do kiełkowania w niekorzystnych warunkach środowiskowych oraz zachowanie zdolności kiełkowania po dłuższym przechowywaniu (ISTA, 2015).

Żywotność nasion określa się jako zdolność do kiełkowania, która prowadzi do powstania rośliny zdolnej do reprodukcji, czyli wytworzenia nasion (Sano i in., 2016). Mierzona jest zdolnością kiełkowania wyrażoną procentowym udziałem nasion normalnie skielkowanych po określonym czasie (Rao i in., 2017). Zdolność kiełkowania ma podstawowe znaczenie w ocenie nasion, zarówno wartości siewnej jak i w ocenie materiału przechowywanego w banku genów (Hay i in. 2013, Fu i in, 2015). Maksymalny okres, w którym nasiona zachowują żywotność określa się jako długość życia nasion (Nadarajan i in., 2023; Probert i in., 2007). Szereg czynników decyduje o tym jak długo nasiona pozostają żywotne. Długość życia nasion zależy przede wszystkim od czynników genetycznych jak i morfologicznych charakterystycznych dla gatunku rośliny, a także od warunków siedliskowych i pogodowych w okresie wzrostu i rozwoju rośliny młodej. Istotne znaczenie mają także warunki przechowywania nasion, głównie temperatura i wilgotność oraz zawartość tlenu w powietrzu (Nadarajan i in., 2023; Solberg i in., 2020; Rao i in., 2017). Bardzo ważnym parametrem jest wilgotność nasion. Toteż w zależności od tolerancji na odwadnianie nasiona zostały podzielone

na 3 kategorie: nasiona typu orthodox (tolerancyjne na wysychanie), nasiona typu recalcitrant (wrażliwe na wysychanie) oraz nasiona pośrednie (umiarkowanie tolerancyjne na wysychanie) (Roberts, 1973; Walters i in., 2013; Zhang i in., 2021; Boczkowska i in., 2018). Szacuje się, że około 75–80% roślin okrytozalążkowych wytwarza nasiona typu orthodox, które tolerują suszenie poniżej 10% wilgotności, zazwyczaj niższej niż występującej naturalnie w przyrodzie. W związku z tak niską zawartością wody, nasiona typu orthodox mogą być przechowywane długoterminowo w temperaturze -18°C , co znacząco wydłuża czas, w którym zachowują żywotność (Ellis i in., 1991; Walters i in., 2013; Walters, 2015). Większość gatunków roślin uprawnych występująca w strefie klimatu umiarkowanego wytwarza nasiona typu orthodox (Boczkowska i in., 2018).

Zdolność kiełkowania nasion maleje wraz z ich wiekiem, przy czym w zależności od gatunku, tempo utraty żywotności nasion przechowywanych w tych samych warunkach jest różne (Walters i in., 2005; Nagel i Borner, 2010). Zoptymalizowanie warunków przechowywania pozwala na długotrwałe utrzymywanie nasion w stanie żywym. Jednak proces starzenia nie zostaje całkowicie zahamowany, a jedynie spowolniony, co sprawia, że nasiona zdeponowane w bankach genów również wymagają regeneracji (Nadarajan i in., 2023; Boczkowska i in., 2018). Jednakże dokonuje się wszelkich starań, aby regenerację prowadzić możliwie rzadko z uwagi na koszty z tym związane oraz na utrzymanie obiektów w czystości genetycznej. Stąd konieczność monitorowania żywotności nasion. Co prawda częste badania żywotności powodują utratę nasion, ale należy pamiętać, że opóźnienie monitoringu może prowadzić do znacznego spadku żywotności. W konsekwencji zaawansowane starzenie się nasion może spowodować zmiany genetyczne lub nawet utratę obiektu kolekcyjnego (Pathirana i Carimi, 2022). Regeneracja powinna być przeprowadzona, gdy żywotność spadnie poniżej 85% żywotności początkowej lub gdy ilość nasion pozostająca w przechowalni jest mniejsza niż wymagana dla trzech wysiewów reprezentatywnej populacji danego obiektu. Ocena zmian żywotności nasion poszczególnych gatunków roślin poddanych długotrwałemu przechowywaniu powinna być przeprowadzona w sposób precyzyjny i wiarygodny (FAO, 2013; ISTA, 2015).

4.3. Długość życia nasion w zależności od warunków przechowywania

Naukowcy zajmujący się badaniami dotyczącymi żywotności nasion roślin uprawnych przechowywanych długoterminowo w temperaturze otoczenia jak i w obniżonej temperaturze zgadzają się, że długość życia nasion zależy od warunków przechowywania i jest różna u poszczególnych gatunków (Priestley i in., 1985; Steiner i Ruckenbauer, 1995; Walters i in., 2005; Nagel i Börner, 2010). Nasiona mogą zachowywać żywotność przez zaledwie kilka dni, kilka miesięcy, przez kilka lub kilkanaście lat, a nawet przez dziesięciolecia (Zhang i in., 2021). Tak duże różnice w żywotności nasion poszczególnych gatunków zależą od tempa starzenia, które związane jest z procesami molekularnymi (Puchta i in., 2020), biochemicznymi (Sano i in., 2015), fizjologicznymi (Bewley i Black, 2014) i metabolicznymi (Buitnik i Leprince, 2008). Pomimo wielu badań dotyczących mechanizmów odpowiedzialnych za starzenie się nasion, nie określono dotychczas, w jakim stopniu poszczególne czynniki decydują o jego tempie (Sano i in., 2015; Boczkowska i in., 2018; Nadarajan i in., 2023).

Rośliny wykształciły dwie główne strategie ochrony nasion przed czynnikami stresującymi: system ochrony i naprawy. Mechanizm ochronny obejmuje m. in. tworzenie szklistej cytoplazmy w celu zmniejszenia aktywności metabolicznej komórek poprzez ograniczenie mobilności molekuł (Buitnik i Leprince, 2008). Kolejny mechanizm to produkcja przeciwutleniaczy, które zapobiegają akumulacji utlenionych makrocząsteczek. Z kolei system naprawczy usuwa uszkodzenia nagromadzone w DNA, RNA i białkach dzięki aktywności enzymów uruchamianych w trakcie imbibicji (Sano i in., 2015).

Badania wskazują, iż w stabilizacji stanu szklistej cytoplazmy i tolerancji nasion na odwodnienie biorą udział białka LEA (ang. late embryogenesis abundant proteins). Większość badań *in vivo* wykazuje ochronną funkcję białek LEA w odniesieniu do stresu osmotycznego. Białka te prawdopodobnie chronią zarodek przed wysuszeniem i zapobiegają agregacji białek. Obniżenie poziomu transkryptu genów kodujących białka LEA wpłynęło negatywnie na długość życia nasion u *Arabidopsis* (Hundermarkt i in., 2011) i grochu (Dehaye i in., 1997).

Uważa się, że jedną z głównych przyczyn starzenia się nasion są reaktywne formy tlenu i stres oksydacyjny powstały w wyniku ich nagromadzenia się w komórkach. Reaktywne formy tlenu powodują uszkodzenia białek, kwasów nukleinowych, cukrów i lipidów zaburzając funkcjonowanie komórek. Badania wskazują też, że metylacja DNA wpływa na starzenie się

nasion. Wykazano, że w starzejących się nasionach pszenicy (Singh i in., 2013) i *Arabidopsis* (Cho i in., 2012) wzrastał poziom metylacji DNA.

W ostatnich latach prowadzone są badania dotyczące roli małowcząsteczkowych RNA w procesie starzenia się i kiełkowania nasion. Wykazano, że w kiełkowanie nasion zaangażowana jest duża liczba rodzin miRNA (mikroRNA), co wskazuje, iż cząsteczki te mogą również brać udział w regulacji procesu starzenia podczas długotrwałego przechowywania (Puchta, 2020). Zbadano poziom miRNA w nasionach jęczmienia przechowywanych długoterminowo. Poziom większości znanych i nowo zidentyfikowanych miRNA pozostawał stabilny niezależnie od tego, czy nasiona były w pełni żywotne, czy charakteryzowały się bardzo niską zdolnością kiełkowania, a także czy były długotrwale przechowywane, czy też nie. Można zatem stwierdzić, że jest to jedyna klasa RNA, która nie ulega degradacji w starzejących się nasionach i jest wyjątkowo stabilna (Puchta i in., 2021).

Bardzo istotnym czynnikiem wpływającym na żywotność nasion jest temperatura, w jakiej są przechowywane. Priestley i in. (1985) zbadali wpływ przechowywania nasion w temperaturze powyżej 0°C na żywotność 92 gatunków roślin przetrzymywanych w 13 magazynach w różnych lokalizacjach na terenie różnych krajów. Nasiona były przechowywane w workach na półkach przez okres do 35 lat. Badania wykazały, że żywotność nasion obniżyła się w ciągu kilku lat. Badane obiekty zachowały żywotność średnio przez 7 lat, niektóre z nich krócej np. 5 lat, a niektóre dłużej np. 11 lat. Obliczono wskaźnik P50 mówiący o tym, po jakim czasie zdolność kiełkowania obniży się do 50% wyjściowej zdolności kiełkowania. Wartość P50 dla badanych obiektów wynosiła od 2,75 do 24,1. Badania przeprowadzone przez Nagel i Börner (2010) również wykazały, iż u większości testowanych obiektów przetrzymywanych w temperaturze pokojowej (18 gatunków przechowywanych przez 26 lat) żywotność obniżyła się po 5–10 latach. Wyjątek stanowiły niektóre zboża i rośliny strączkowe. Żywotność nasion badanych gatunków pozostawała relatywnie wysoka, przez co najmniej pierwsze 2 lata przechowywania, następnie obniżyła się do 0 w ciągu 5–23 lat, co daje średnie P50 dla wszystkich gatunków na poziomie 8,6+/-3,6 lat. Najdłużej żywotność zachowały groch, fasola i kukurydza (odpowiednio 23, 21, 19 lat), a najkrócej czosnek, szczypiorek i sałata (odpowiednio 5 i 7 lat).

Pierwsze badania dotyczące żywotności nasion przechowywanych w stałych warunkach zainicjowano wraz z tworzeniem odpowiednich przechowalni w bankach genów

(Walters i in., 2005). Pomimo dużej liczby banków genów na świecie, niewiele jest opublikowanych danych dotyczących żywotności nasion przechowywanych długoterminowo.

Nagel i in. (2010) przebadali po kilkadziesiąt obiektów sześciu gatunków roślin, których nasiona były przechowywane przez okres 26–33 lat w temperaturze 0°C w banku genów w Gatersleben. Badania te pozwoliły ocenić różnicę żywotności nasion pomiędzy obiektami w obrębie tego samego gatunku. Żywotność wszystkich badanych obiektów nie różniła się istotnie po 5 latach przechowywania, natomiast po 20 latach zaobserwowano już znaczące zmiany. Duże różnice w żywotności odnotowano u pszenicy, gdzie po 33 latach przechowywania jedne obiekty zachowały zdolność kiełkowania na poziomie 87%, a u innych spadła ona do zera. Natomiast dla jęczmienia przechowywanego w banku genów przez 35 lat zdolność kiełkowania wynosiła od 43% aż do 95% w zależności od obiektu.

Badania dotyczące żywotności nasion obiektów przechowywanych w banku genów w USA przeprowadziła Walters wraz z zespołem (Walters i in., 2005). Były one kontynuacją badań zainicjowanych w 1977 przez Stanwood, w których porównywano żywotność 42 gatunków przechowywanych w temperaturze +5, -18 i -196°C. Badania Walters objęły aż 41286 obiektów należących do 276 różnych gatunków. Nasiona przechowywano przez okres 16–81 lat, a średni okres wynosił 38 lat. Nasiona przetrzymywano najpierw w temperaturze +5°C, a następnie zostały przeniesione do przechowalni, w której panowała temperatura -18°C. Dla większości próbek czas przechowywania w temperaturze -18°C wynosił 24–26 lat. Zdolność kiełkowania obniżała się w różnym tempie dla poszczególnych obiektów. Zdolność kiełkowania u niektórych gatunków obniżyła się do 0% po 37 (*Datura ferox*), 33 (*Capsicum baccatum*), czy 18 (*Bromus sitchensis*) latach. Natomiast dla nasion *Hibiscus micranthus* po 40 latach przechowywania zdolność kiełkowania wynosiła aż 100%.

Dotychczas opublikowane badania dotyczące żywotności nasion z rodzaju *Nicotiana* są sprzeczne. Kincaid (1943) stwierdził, że nasiona tytoniu straciły zdolność kiełkowania po trzech latach, kiedy były przechowywane w pojemnikach w laboratorium.

Kolejne badania na temat żywotności nasion dotyczyły przechowywania ich w glebie. Toole i Brown (1946) opublikowali wyniki długoletniego doświadczenia dotyczącego żywotności nasion różnych gatunków roślin, które zakopano na różnych głębokościach w glebie. Zdolność kiełkowania oceniano przez 39 lat. Nasiona *Nicotiana tabacum*

charakteryzowały się najwyższą zdolnością kiełkowania po 10 latach, ale po 39 latach przechowywania w glebie nadal kiełkowały.

Pierwsze informacje na temat żywotności nasion w warunkach pozapolowych przedstawione przez Priestley i in. (1985) uwzględniały również tytoń. Obliczono czas (P50), po którym wyjściowa zdolność kiełkowania obniży się do 50%. Dla *Nicotiana tabacum* czas ten wynosił 10 lat.

Tytoń uwzględniono również w badaniach dotyczących żywotności nasion przechowywanych długoterminowo w banku genów w USA (Walters i in., 2005). Zdolność kiełkowania nasion *Nicotiana tabacum* przechowywanych przez 25 lat w temperaturze 5°C wynosiła 89%, natomiast wskaźnik P50 wynosił 81 lat. Natomiast dla nasion *Nicotiana tabacum* przechowywanych przez 45 lat w temperaturze -18°C (ale wcześniej przechowywanych w +5°C) wskaźnik P50 wynosił 31 lat, a zdolność kiełkowania 13%, podczas gdy wyjściowa zdolność kiełkowania wynosiła 91%. Biorąc pod uwagę wyniki badań własnych i dostępne w literaturze, Walters i in. określili tytoń jako gatunek o zróżnicowanej żywotności.

W związku z istniejącymi rozbieżnościami dotyczącymi żywotności nasion tytoniu przechowywanych długoterminowo, w niniejszej pracy podjęto badania mające na celu ocenę żywotności nasion *Nicotiana tabacum* jak i *Nicotiana rustica* zdeponowanych w kolekcjach różnych banków genów w zróżnicowanych warunkach przechowania.

4.4. Identyfikacja QTL

Wiele rolniczo i ekonomicznie istotnych cech takich jak: plon i jego jakość, odporność na niektóre stresy biotyczne i abiotyczne, czy żywotność nasion są kontrolowane przez działanie wielu genów tzw. poligenów (geny kumulatywne). Tego typu cecha nazywana jest ilościową, a regiony genomu (loci) kontrolujące tę cechę nazywane są QTL (ang. Quantitative Trait Loci) (Szyp-Borowska, 2005). Pierwsze prace dotyczące poszukiwania loci odpowiedzialnych za predyspozycje nasion do długotrwałego przechowywania podjęto dla *Arabidopsis* (Bentsink i in., 2000), a z roślin uprawnych – dla ryżu (Miura i in., 2002). Ponadto identyfikacji QTL związanych z żywotnością nasion dokonano w takich roślinach uprawnych jak: soja

(Singh i in., 2008), jęczmień (Nagel i in., 2014), kukurydza (Revilla i in., 2009), pszenica (Landjeva i in., 2010; Rehman Arif i in., 2012), sałata (Schwember i Bradford, 2010) czy rzepak (Nagel i in., 2011).

U *Arabidopsis* zidentyfikowano cztery QTL związane z żywotnością nasion zlokalizowane na 3 chromosomach (Bentsink i in., 2000). Natomiast w kolejnych badaniach z użyciem innej populacji mapującej (Clerkx i in., 2004) wykryto trzy QTL na trzech chromosomach, z czego dwa loci znajdowały się w pozycjach bardzo zbliżonych do tych wykrytych przez zespół Bentsink (2000). Kolejne badania dotyczące genetycznych podstaw żywotności nasion u *Arabidopsis* przeprowadzono na 6 populacjach RIL zarówno po długotrwałym przechowywaniu, jak i sztucznym starzeniu. Biorąc pod uwagę różne parametry kiełkowania (czas do osiągnięcia 10% i 50% kiełkowania) oraz pole powierzchni (AUC) opisujące krzywą kiełkowania na podstawie szybkości kiełkowania, zidentyfikowano pięć loci związanych z żywotnością nasion, rozmieszczone na 4 chromosomach (Nguyen i in., 2012).

Liczne badania dotyczące genetycznych podstaw żywotności nasion przeprowadzono dla ryżu. Zostały one zapoczątkowane przez Miura i in. (2002), a w kolejnych latach zidentyfikowano ponad 70 QTL związanych z żywotnością nasion i zdolnością do długotrwałego przechowywania (Wu i in., 2021; Zeng i in., 2006; Xue i in., 2008; Gan i in., 2005; Sasaki i in., 2005; Li i in., 2012). Wiele QTL regulujących żywotność zostało zidentyfikowanych dla takich cech jak: zawartość wolnych kwasów tłuszczowych, szybkość kiełkowania, energia kiełkowania, średni czas kiełkowania i P50 zarówno w nasionach naturalnie starzejących się jak i sztucznie postarzanych (Wu i in., 2021).

Chociaż zidentyfikowano wiele QTL i genów powiązanych ze zdolnością przechowywania nasion ryżu, szczegółowe mechanizmy genetyczne odpowiedzialne za tę cechę pozostają nadal niejasne. Tylko kilka z wykrytych QTL zostało dokładnie zmapowanych. Sklonowano kilka genów takich jak: geny kodujące dehydrogenazę aldehydową (zaangażowaną w usuwanie szkodliwych aldehydów powstałych w wyniku stresu oksydacyjnego w suchych nasionach), lipooksygenazę (katalizującą reakcje utleniania kwasów tłuszczowych) oraz O-metylotransferazę L-izoaspartylu (enzym przywracający funkcje białek uszkodzonych w wyniku starzenia) (Wu i in., 2021).

Badania dotyczące żywotności nasion i ich zdolności do długotrwałego przechowywania prowadzono również w jęczmieniu. Nagel i in. (2009) przeprowadzili badania na 3 populacjach

podwojonych haploidów poddanych sztucznemu postarzaniu. Zidentyfikowano QTL wyjaśniające zmienność fenotypową aż w 54%. Stwierdzono, że allele pozytywnie warunkujące żywotność nasion pochodziły od rodziców wykształcających kłosa o niezmienionej architekturze oraz wytwarzających ziarno oplewione. Jest to cecha istotna, ponieważ oplewione ziarniaki dłużej zachowują żywotność. Lepsze zrozumienie genetycznych podstaw długowieczności nasion jęczmienia umożliwiło połączenie genetyki ilościowej i technologii "omicznych" w liniach blisko izogenicznych (NIL) jęczmienia. Analizy pozwoliły na zidentyfikowanie genu UDP-glikozylotransferazy, jako genu kandydackiego dla *loci* cech ilościowych zlokalizowanych na chromosomie 2H, a gen zależnego od NADP enzymu jabłczanowego (NADP-ME) jako możliwy gen docelowy. Aby zweryfikować geny kandydackie, przeniesiono je do mutantu *Arabidopsis*, którego nasiona charakteryzują się niską zdolnością kiełkowania. Ekspresja tych genów wpłynęła pozytywnie na zdolność kiełkowania nasion stransformowanego mutantu *Arabidopsis nadp-me1*. Nasiona mutantu z przeniesionymi genami wykazywały wyższą zdolność kiełkowania w teście sztucznego postarzania w porównaniu z nasionami nietransformowanymi (Wozny, 2018).

Kolejnym gatunkiem roślinnym, w którym dość szeroko badano genetyczne podstawy żywotności nasion jest pszenica. W pierwszych badaniach przeprowadzonych na populacji DIL zidentyfikowano 5 QTL związanych z żywotnością nasion, które były zbieżne z QTL wykrytymi dla kiełkowania i wigoru (Landjeva i in., 2010). W dalszych badaniach wykorzystano 114 rekombinacyjnych linii wsobnych pszenicy do analizy QTL oraz 96 odmian pszenicy do analizy asocjacji (GWAS) (Arif i in., 2012). W populacji mapującej wykryto regiony QTL dla żywotności w nasionach poddanych dwóm testom postarzania. Co ciekawe *loci* wykryte w nasionach postarzanych dwoma różnymi sposobami różniły się od siebie. Opracowanie znacznie bardziej nasyconej mapy opartej o 7584 markerów polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) (Arif i in., 2021) pozwoliło na wykrycie nowych *loci* związanych z żywotnością nasion pszenicy. Znaleziono 31 QTL związanych z długowiecznością nasion oraz 14 innych QTL dla spoczynku. Ponadto w pszenicy wykryto 29 par epistatycznych QTL związanych z żywotnością nasion, co było możliwe w związku z opracowaniem nowych narzędzi statystycznych. Następnie określono kolejne geny kandydujące związane z cechami powiązanymi z żywotnością nasion. Niektóre z tych genów

regulują odporność roślin na stresy, a w pszenicy biorą udział w odporności na fuzariozę kłosów (Arif i in., 2022).

Badania nad genami leżącymi u podstawy żywotności nasion w trakcie przechowywania prowadzono także dla kukurydzy. Oceniono wigor i zdolność kiełkowania wybranych linii wsobnych kukurydzy przechowywanych przez okres 1–17 lat w kolekcji aktywnej w temperaturze 2°C i wilgotności sięgającej 55% (Revilla i in., 2006). Żywotność nasion zmniejszała się liniowo wraz z wiekiem dla większości linii wsobnych, poza kilkoma wyjątkami. Ponadto nasiona zregenerowane z próbek przechowywanych przez ponad 10 lat charakteryzowały się większym wigorem i zdolnością kiełkowania w porównaniu do początkowej zdolności kiełkowania. Nasiona zregenerowane z próbek przechowywanych krótko nie różniły się znacząco parametrami kiełkowania w porównaniu do oryginalnych nasion. Wyniki te wskazują na działanie naturalnej selekcji podczas przechowywania. Nasiona o słabym wigorze zamierają, natomiast te, które przetrwają wytwarzają nasiona o większym wigorze niż rodzice (Revilla i in., 2006). Zespół Revilla przeprowadził dalsze badania, w których porównano siewki kiełkujących nasion i zarodki z martwych nasion, co pozwoliło na wykrycie kolejnych QTL związanych z żywotnością nasion kukurydzy (Revilla i in., 2009). Funkcje zaproponowanych genów kandydujących związanych z żywotnością nasion kukurydzy były powiązane z odpowiedzią na stres, z procesami energetycznymi w komórkach, z metabolizmem białek i translacją, z modyfikacją białek i transdukcją sygnału oraz ze wzrostem i podziałem komórek (Han i in., 2014). Późniejsze badania z mutantami kukurydzy dostarczyły dowodów na to, że żywotność nasion kukurydzy jest regulowana przez ten sam gen, którego ekspresja w siewkach jest indukowana przez stresy abiotyczne (chłód, odwodnienie, wysokie zasolenie i stres cieplny). Gen ten pełni rolę w stymulacji produkcji rafinozy, która wpływa pozytywnie na wigor nasion (Han i in., 2020). W kolejnych badaniach, w których wykorzystano populację F2:3 oraz populację RIL, zidentyfikowano markery, które mogą być wykorzystane do selekcji genotypów kukurydzy o wysokim potencjale przechowalniczym (Guo i in., 2021).

Nowoczesne odmiany soi, które opracowano z myślą o wysokich plonach i szerokich możliwościach adaptacyjnych, charakteryzuje szybka utrata wigoru nasion w trakcie przechowywania, zwłaszcza w wysokiej temperaturze i wysokiej wilgotności powietrza. Opracowano liczne markery molekularne, co ma duże znaczenie dla hodowli roślin, ponieważ

ich zastosowanie umożliwia wyselekcjonowanie odmian lub linii tolerujących długotrwałe przechowywanie (Rao i in., 2023). Jedno z pierwszych badań opublikowanych w 2013 roku, przeprowadzono na 33 genotypach soi, które różniły się zdolnością przechowalniczą i kolorem okrywy nasiennej. Wykorzystano markery genetyczne SSR i RAPD, które wykazały związek pomiędzy kolorem okrywy nasiennej a tolerancją nasion na przechowywanie. Genotypy o czarnej okrywie nasiennej charakteryzowały się wyższą zdolnością przechowalniczą w porównaniu z nasionami o okrywie żółtej zarówno w starzejących się naturalnie, jak i sztucznie postarzanych (Hosamani i in., 2013).

Kolejne badania z wykorzystaniem naturalnie i sztucznie starzejących się nasion dwóch populacji mapujących RIL oraz genetycznej mapy o wysokiej rozdzielczości pozwoliły na wykrycie kilkudziesięciu QTL w genomie soi. QTL dla cech związanych z kiełkowaniem nasion, które zostały znalezione w obydwu populacjach RIL i w obydwu warunkach starzenia, są to stabilne regiony genomowe regulujące dziedziczenie zdolności do przechowywania nasion soi (Zhang i in., 2019).

Ostatnie dane na temat QTL związanych z żywotnością nasion soi przeprowadzono na nasionach populacji RIL przechowywanych w -20°C (temperatura przechowywania w bankach genów) oraz sztucznie postarzanych. Nie wykryto QTL wspólnych dla obydwu typów starzenia, natomiast wytypowano 15 genów kandydackich, które mogą determinować wigor nasion soi (Wang i in., 2021).

Dotychczas tylko jedna praca (Schwember i Bradford, 2010) przedstawia genetyczne podstawy żywotności nasion w trakcie długotrwałego przechowywania u sałaty. Badania opublikowane w 2010 roku przeprowadzono na nasionach populacji RIL starzejących się naturalnie oraz poddanych procedurze sztucznego postarzania. Zidentyfikowano wiele QTL związanych z żywotnością nasion sałaty jednak nie znaleziono wspólnych QTL dla nasion sztucznie postarzanych i przechowywanych konwencjonalnie. Autorzy wnioskują, iż różne mechanizmy biorą udział w starzeniu się nasion przechowywanych konwencjonalnie a tych poddanych sztucznemu postarzaniu. Ponadto nie wykryto tych samych QTL, gdy nasiona populacji RIL były pozyskiwane w różnych latach. Wskazuje to, że żywotność i wigor nasion sałaty są silnie uzależnione od czynników środowiska, w których nasiona się rozwijają i dojrzewają (Schwember i Bradford, 2010).

Stosunkowo późne opublikowanie mapy genetycznej tytoniu wynika zapewne z wielkości jego genomu. Szacuje się, że genom tytoniu ma wielkość około 4,5 miliarda par zasad i jest 4 razy większy od genomu pomidora i ziemniaka, a także 1,5 raza od genomu ludzkiego. Wynika to z faktu, iż gatunek *Nicotiana tabacum* powstał w wyniku hybrydyzacji pomiędzy dwoma gatunkami: *N. sylvestris* i *N. tomentosiformis* (Kenton i in., 1993). Wielkość i złożoność genomu tytoniu spowodowała, że w porównaniu do innych gatunków, był on w niewielkim stopniu opisany molekularnie (Bindler i in., 2007). Dopiero w ostatnich latach podjęto działania mające na celu poznanie genomu tytoniu uprawnego, a uzyskane dane są systematycznie umieszczane na stronach RIKEN Center for Biosystems Dynamics i NCBI GenBank.

Pierwsza mapa genetyczna tytoniu została opublikowana w 2007 roku (Bindler i in., 2007). Powstała w oparciu o 282 markery mikrosatelitarne i choć nie pokryła w pełni genomu, dostarczyła cennych informacji i stała się podstawą badań genetycznych nad tytoniem (Moon i in., 2008; Vontimitta i in., 2010). Ponieważ jednak mapa ta nie była wystarczająca do wielu celów hodowlanych, toteż w 2011 roku zespół Bindlera opublikował nową mapę w oparciu o 5119 nowych i funkcjonalnych markerów mikrosatelitarnych. Dzięki temu mapa mogła zostać wykorzystana w hodowli tytoniu czy analizach porównawczych genomu (Bindler i in., 2011). Opracowanie coraz większej liczby markerów w kolejnych latach umożliwiło skonstruowanie wysokorozdzielczych map genetycznych (Tong i in., 2020, Tong i in., 2023) pozwalając na zwiększenie precyzji mapowania QTL.

W związku z tym, iż mapy genetyczne tytoniu zostały opracowane stosunkowo niedawno, niewiele jest badań dotyczących mapowania QTL w tym gatunku. Dotychczas mapowanie QTL wykorzystywano w tytoniu przede wszystkim do identyfikacji regionów związanych z odpornością na choroby grzybowe (Vontimitta i Lewis, 2012a; Vontimitta i Lewis, 2012b; Xiao i in., 2013) i bakteryjne (Nisi i in., 2013; Drake–Stowe i in., 2017) oraz z cechami agronomicznymi i jakościowymi surowca (Lewis i in., 2007; Julio i in., 2006; Tong i in., 2023). Nie prowadzono natomiast mapowania QTL związanych z żywotnością nasion tytoniu, co stało się przedmiotem badań zawartych w niniejszej pracy.

5. Materiał i metody badawcze

5.1. Materiał badawczy

5.1.1. Materiał w badaniach dotyczących oceny żywotności nasion

Do oceny wpływu warunków przechowywania na żywotność nasion rodzaju *Nicotiana* materiał badawczy stanowiły:

- a. nasiona 110 obiektów gatunku *Nicotiana tabacum* wybranych losowo z kolekcji krajowej, zregenerowanych w latach 2000–2010 w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – PIB w Puławach, przechowywanych przez okres od 2 do 12 lat w papierowych torebkach w laboratorium IUNG-PIB w temperaturze pokojowej 18–22°C i wilgotności powietrza w pomieszczeniu 45–60% RH; z każdego roku wybierano losowo po 10 obiektów;
- b. nasiona 104 obiektów *Nicotiana tabacum* i *Nicotiana rustica* zregenerowanych w latach 2000–2010 w Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research w Gatersleben, przechowywanych przez okres od 2 do 12 lat w papierowych torebkach w warunkach podlegających ścisłej kontroli ($20,3 \pm 2,3^{\circ}\text{C}$; $50,5 \pm 6,3\%$ RH w pomieszczeniu); z każdego roku wybierano losowo 10 obiektów (z wyjątkiem roku 2001, kiedy przebadano 9 obiektów i roku 2000, gdy przebadano 5 obiektów);
- c. nasiona 227 obiektów *Nicotiana tabacum* zregenerowanych w latach 1981–2000 w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – PIB w Puławach, a przechowywanych w przechowalni średnioterminowej KCRZG IHAR-PIB, przez okres od 14 do 33 lat w papierowych torebkach w szklanych słoikach zamykanych próżniowo, w temperaturze 0°C i przy wilgotności nasion 4% (tab. 2);
- d. nasiona 226 obiektów rodzaju *Nicotiana tabacum* i *Nicotiana rustica* zregenerowanych w latach 1975–2000 w Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research w Gatersleben (IPK) przechowywanych w przechowalni długoterminowej przez okres od 14 do 39 lat w hermetycznych szklanych słoikach, w temperaturze -18°C i przy wilgotności nasion 6% (tab. 2).

Tabela 2. Liczba obiektów *N. tabacum* i *N. rustica* wybranych do badań i zregenerowanych w IUNG-PIB i IPK (nasiona zdeponowano w przechowalniach średnio- i długoterminowych odpowiednio IHAR-PIB i IPK) w latach 1975–2000

Rok regeneracji	Liczba obiektów zregenerowanych w:		
	IPK		IUNG-PIB
	<i>N. tabacum</i>	<i>N. rustica</i>	<i>N. tabacum</i>
1975	82	22	-
1976	42	20	-
1977	26	7	-
1978	17	21	-
1979	9	1	-
1980	1	3	-
1981	23	5	20
1982	10	1	19
1983	-	-	23
1984	3	4	20
1985	5	9	-
1987	2	4	-
1988	2	-	25
1989	2	-	-
1990	-	1	20
1991	2	-	-
1994	-	-	20
1996	-	-	20
1997	-	-	20
1998	-	-	20
2000	-	-	20

5.1.2. Materiał badawczy wykorzystany do identyfikacji QTL warunkujących żywotność nasion *Nicotiana tabacum*

W celu identyfikacji rejonów QTL warunkujących żywotność nasion tytoniu wykorzystano dwie populacje mapujące stworzone wcześniej do identyfikacji *loci* warunkujących odporność na zgniliznę pierścieniową podstawy łodygi w tytoniu powodowaną przez *Phytophthora nicotianae* (Xiao i in., 2013; Vontimitta i Lewis, 2012).

Populacje te posłużyły do badań związanych z żywotnością nasion, ponieważ odmiany rodzicielskie wykorzystane do krzyżowania różniły się także pod względem tej cechy (co potwierdziły wstępne badania własne). Ponadto badania nad innymi gatunkami również wskazywały, iż geny warunkujące żywotność nasion często znajdowały się w tym samym *locus* co geny warunkujące odporność na choroby (Arif i in., 2022).

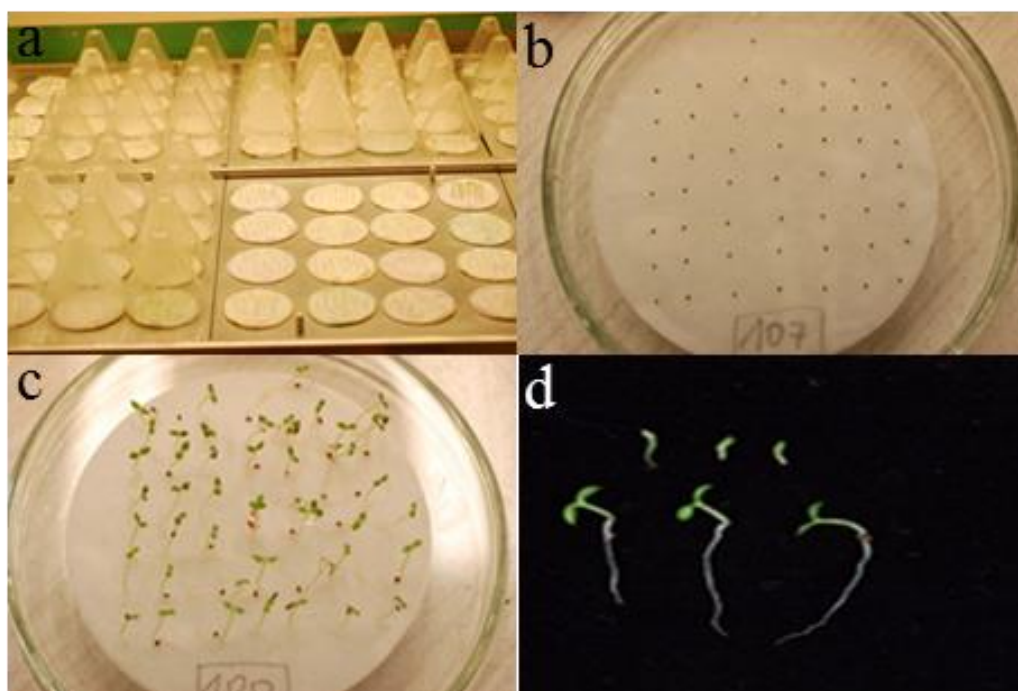
Pierwsza populacja mapująca wykorzystana w badaniach składała się ze 122 rekombinacyjnych linii wsobnych otrzymanych w wyniku krzyżowania odmiany uprawnej tytoniu cygarowego Florida 301 i odmiany tytoniu papierosowego jasnego Hicks, z których pierwsza jest odporna, a druga podatna na zgniliznę pierścieniową podstawy łodygi. Populacja mapująca została uzyskana techniką pojedynczego ziarna. Populację zmapowano przy użyciu 339 markerów mikrosatelitarnych. Nasiona populacji RIL zostały uzyskane w 2007 roku, natomiast nasiona linii rodzicielskich uzyskano w 2004 roku. Do czasu przeprowadzenia badań własnych w 2014 roku nasiona przechowywano w laboratorium (North Carolina State University, USA) w temperaturze otoczenia i względnej wilgotności powietrza wynoszącej około 30% (Xiao i in., 2013).

Drugą populację mapującą stanowiło 118 osobników podwojonych haploidów otrzymanych w wyniku krzyżowania linii tytoniu cygarowego Beinhart–1000 odpornej na zgniliznę pierścieniową podstawy łodygi i podatnej odmiany Hicks. Do utworzenia mapy genetycznej otrzymanej populacji wykorzystano 256 markerów mikrosatelitarnych. Nasiona zostały wyprodukowane w szklarni w Raleigh, North Carolina State University, USA w 2014 roku. Po zbiorach, do momentu wykonania badań własnych w 2016 roku, były przechowywane w laboratorium w temperaturze otoczenia w warunkach niskiej wilgotności względnej powietrza wynoszącej około 30% (Vontimitta i Lewis, 2012).

5.2. Metody badawcze

5.2.1. Test kiełkowania

Żywotność nasion tytoniu oceniano za pomocą testu kiełkowania. Zdolność kiełkowania określano zgodnie z metodyką opracowaną przez ISTA (2012). Testy wykonano na kiełkowniku Jacobsena (Laborstet, Polska) (rys. 2a), na który wykładano po 50 nasion (rys. 2b) każdego obiektu w dwóch powtórzeniach dla nasion z przechowalni średnio- i długoterminowej i w trzech powtórzeniach dla nasion przechowywanych w temperaturze pokojowej. Po 7 dniach liczono siewki kiełkowane nasiona oraz siewki rozwijające się prawidłowo (rys. 2c, 2d). Zdolność kiełkowania na poziomie 75% przyjęto jako wartość, poniżej której obiekty przechowywane w banku genów należy odnowić. Określono zdolność kiełkowania czyli procentowy udział nasion wytwarzających siewki sklasyfikowane jako normalne, bez deformacji, z wykształconymi liśćkami i korzeniami (NG – normal germination) oraz procentowy udział wszystkich kiełkujących nasion (TG – total germination).



Rysunek 2. Test kiełkowania tytoniu (a - kiełkowanie nasion na kiełkowniku Jacobsena, b - wyłożone nasiona, c - 7-dniowe siewki, d - klasyfikacja siewek na normalne - dolny rząd i nienormalne - górny rząd)

Do obliczenia udziału obiektów ze zdolnością kiełkowania większą niż 75% (dla siewek normalnych) w odniesieniu do czasu przechowywania wykorzystano regresję logistyczną. Analizę przeprowadzono za pomocą programu GenStat 16th Edition (VSN International Ltd., Hemel Hempstead, Wielka Brytania).

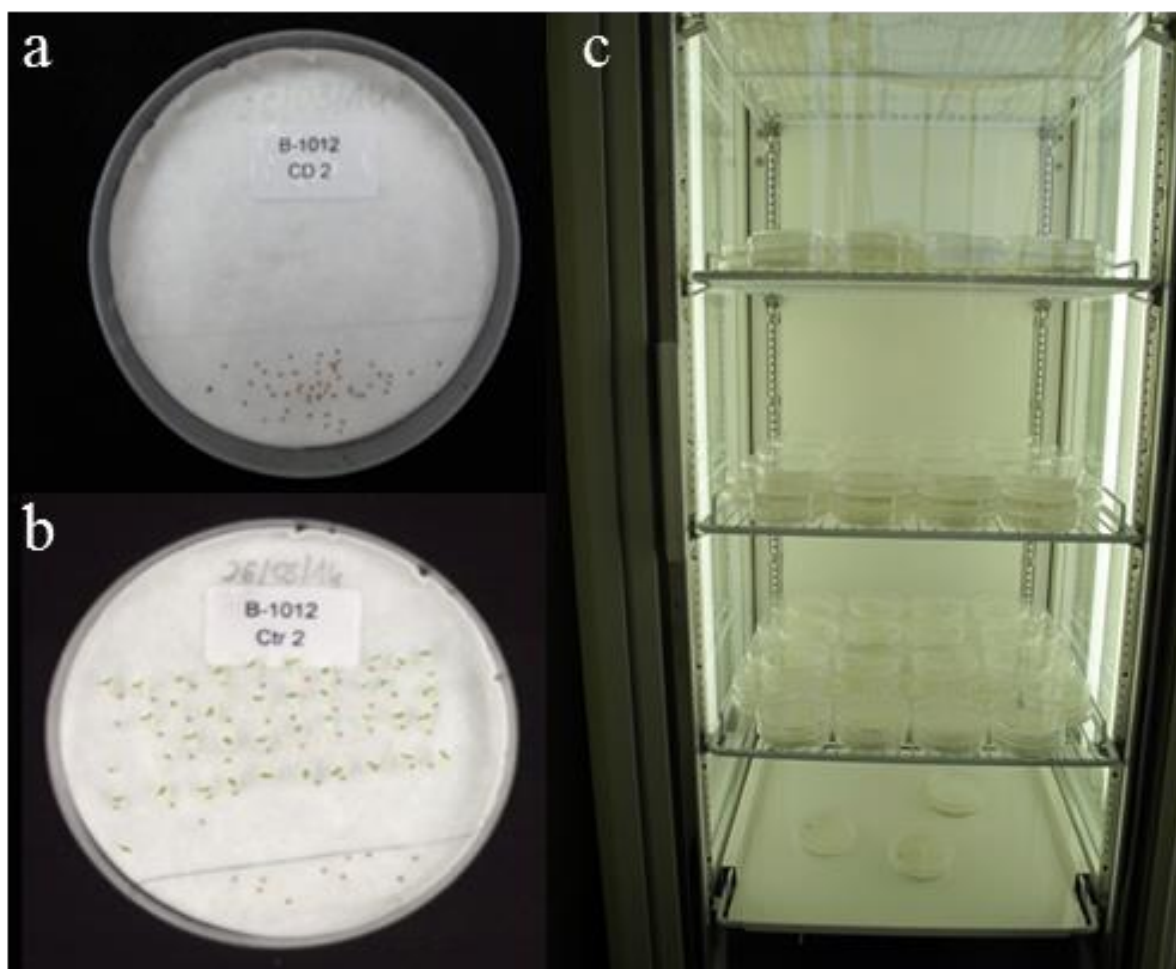
Aby porównać wyjściową żywotność nasion z materiałem testowanym po przechowywaniu, wykonano wykresy ramka-wąsy w programie Origin 8.6 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

5.2.2. Test kontrolowanego starzenia

Do oceny różnic w żywotności nasion, które mogłyby wystąpić w trakcie długotrwałego przechowywania wykorzystano test tzw. kontrolowanego starzenia (CD – controlled deterioration). Test ten służy do prognozowania tempa starzenia się nasion. Test wykonano dla populacji mapujących (Hay i in., 2008). Aby uzyskać identyczną wyjściową wilgotność nasion, umieszczono je w papierowych torebkach i przechowywano w temperaturze $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i wilgotności powietrza wynoszącej 10%. Następnie torebki z nasionami umieszczono na plastikowych stojakach, które znajdowały się nad 8,7 M roztworem chlorku litu w hermetycznie zamkniętych pojemnikach. Pojemniki umieszczono w fitotronie i przechowywano w temperaturze 20°C przez 7 dni. Zastosowanie 8,7 M roztworu chlorku litu i temperatury 20°C pozwoliło na uzyskanie wewnątrz pojemnika wilgotności względnej powietrza wynoszącej 47%. Etap ten minimalizuje zmianę zawartości wilgoci w nasionach, gdy próbki są przenoszone do warunków, w których następuje starzenie. Następnie roztwór chlorku litu zamieniono na 7,1 M i pojemniki umieszczono w fitotronie w temperaturze $+45^{\circ}\text{C}$, co pozwoliło osiągnąć względną wilgotność powietrza wewnątrz pojemnika wynoszącą 60%. Nasiona przetrzymywano w tych warunkach przez 30 dni. Długość ekspozycji na stres dobrano w badaniach wstępnych. Obiekt kontrolny stanowiły nasiona niepoddawane starzeniu. Do testu kiełkowania użyto po 50 nasion w czterech powtórzeniach dla obiektów kontrolnych i dla nasion postarzanych. Nasiona wykładano na zwilżone krążki bibuły umieszczone w szalkach Petriego. Test prowadzono w fitotronie w temperaturze $30/20^{\circ}\text{C}$ w cyklu 8/16 h dzień/noc (rys. 3). Kiełkujące nasiona liczono po 10 dniach od wyłożenia określając procentowy udział nasion wytwarzających siewki normalne oraz liczbę skiełkowanych nasion (ISTA, 2014).

5.2.3. Szybkość kiełkowania

Dla osobników populacji mapujących oceniono szybkość kiełkowania – jeden z parametrów opisujących wigor nasion. W tym celu każdego dnia określano liczbę skielkowanych nasion w trakcie trwania eksperymentu. Na podstawie uzyskanych wyników, przy użyciu pakietu Germinator (Joosen i in., 2010), określono czas potrzebny do skielkowania 50% nasion w próbie (T50) oraz parametr AUC (ang. Area Under the Curve), czyli pole powierzchni pod krzywą czasu kiełkowania. Parametr AUC wyznaczono po 200 godzinach od momentu wyłożenia nasion na bibułę.



Rysunek 3. Ocena szybkości kiełkowania nasion tytoniu: a - wyłożone nasiona, b – 10-dniowe siewki, c - doświadczenie prowadzone w fitotronie

5.2.4. Identyfikacja QTL dla cech związanych z długością życia nasion

Nasiona poddane starzeniu (Controlled Deterioration – CD) oraz kontrolne (Control – C) analizowano pod względem czterech cech związanych z kiełkowaniem nasion:

- a. zdolność kiełkowania - udział nasion wytwarzających siewki sklasyfikowane jako normalne (Normal Germination – Control, %NG-C; Normal Germination-Controlled Deterioration, %NG-CD);
- b. liczba skielkowanych nasion (Total Germination-Control, %TG-C, Total Germination-Controlled Deterioration, %TG-CD);
- c. czas potrzebny do skielkowania 50% nasion w próbie (T50-C, T50-CD);
- d. parametr AUC (Area Under the Curve – pole powierzchni pod krzywą czasu kiełkowania, pomiędzy $t=0$ a zdefiniowanym przez użytkownika punktem końcowym $t=x$), wyznaczone po 200 godzinach kiełkowania (AUC-C, AUC-CD).

W celu identyfikacji QTL na uprzednio skonstruowanej mapie genetycznej populacji mapującej RIL powstałej w wyniku krzyżowania osobników rodzicielskich Florida 301 $\times$ Hicks zastosowano złożone mapowanie interwałowe (Composite Interval Mapping – CIM) przy użyciu programu QTL Cartographer 2.5 (Zeng, 1994).

Te QTL, dla których krzywa LOD (ang. logarithm of odds, test logarytmiczny określający pewność lokalizacji QTL w danym miejscu na chromosomie) przekroczyła wartość 3, a wartość współczynnika determinacji R^2 była $\geq 10\%$, uznano za istotne statystycznie *loci* i nazwano głównym QTL (major QTL). Natomiast QTL, dla których wartość LOD była mniejsza od 3, ale większa niż 2 i które występowały w rejonie, gdzie zlokalizowano główne QTL, były również brane pod uwagę i uznane jako te o mniejszym znaczeniu (minor QTL). Główne QTL można zaliczyć do stabilnych QTL, podczas gdy mniejsze QTL mogą być wrażliwe na warunki środowiskowe.

Z kolei dla populacji mapującej DH powstałej w wyniku krzyżowania osobników rodzicielskich Beinhart-1000 $\times$ Hicks do identyfikacji regionów QTL związanych z żywotnością nasion zastosowano integracyjne złożone mapowanie interwałowe (ICIM – inclusive composite interval mapping) w programie IciMapping v4.2.53. Dla wszystkich analiz przyjęto krok równy 1 cM. Te QTL, dla których wartości LOD były większe

od 2 a mniejsze od 3, posłużyły do identyfikacji QTL określanych jako istotne (significant QTL), natomiast kiedy wartość LOD przekraczała 3, mapowane QTL uznawano jako wysoce istotne (highly significant QTL) (Meng i in., 2015). W przypadku populacji mapującej Beinhart-1000 $\times$ Hicks wybrano integracyjne złożone mapowanie interwałowe, ponieważ metoda ta została opracowana niedawno i w porównaniu ze złożonym mapowaniem interwałowym wykrywa większą liczbę prawdziwie dodatnich QTL i mniejszą liczbę fałszywie dodatnich QTL, wykazuje większą moc i precyzję mapowania. ICIM zachowuje wszystkie zalety CIM i została rozszerzona o mapowanie addytywnych i dominujących QTL, epistatycznych QTL i oddziaływań QTL w zależności od środowiska (Meng i in., 2015).

6. Wyniki badań

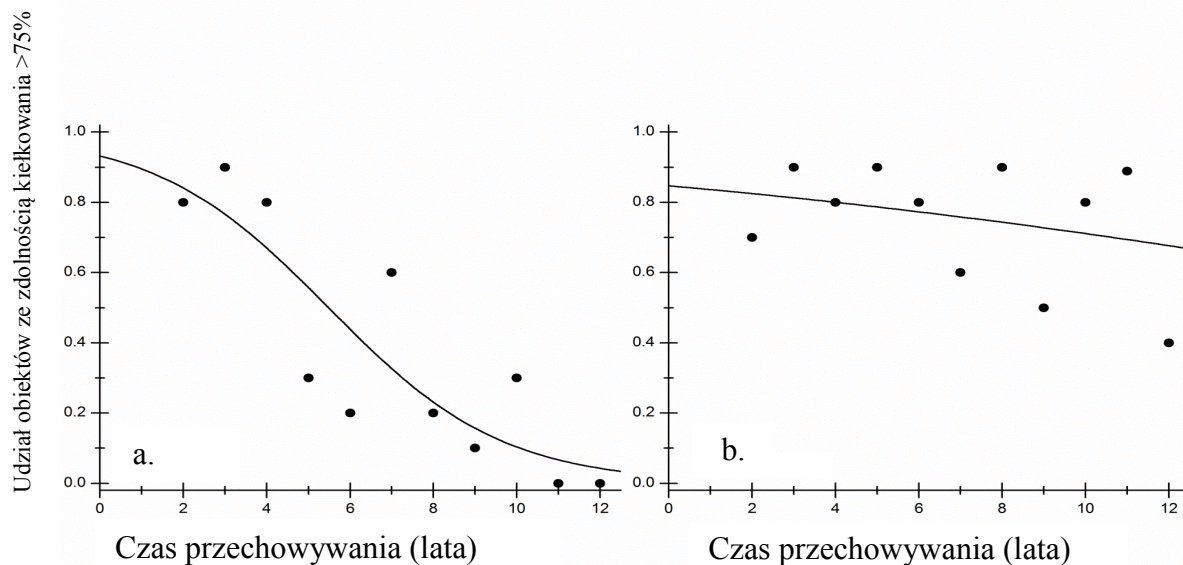
6.1. Wpływ warunków przechowywania na żywotność nasion obiektów z rodzaju *Nicotiana*

6.1.1. Porównanie żywotności nasion tytoniu przechowywanych w warunkach niepodlegających ścisłej kontroli oraz w warunkach kontrolowanej temperatury i wilgotności względnej powietrza

Przeprowadzono ocenę żywotności nasion z rodzaju *Nicotiana* przechowywanych przez okres od 2 do 12 lat w kolekcji roboczej IUNG-PIB w Puławach oraz w banku genów IPK w Gatersleben. Istotne znaczenie w badaniach miały zróżnicowane warunki temperatury i wilgotności podczas przechowywania nasion w tych dwóch lokalizacjach. W IUNG-PIB warunki te nie były stałe, a temperatura powietrza w pomieszczeniu z szafami, w których przechowywano nasiona wahała się od 18–22°C, natomiast wilgotność względna powietrza mieściła się w przedziale 45–60%. W IPK warunki przechowywania podlegały ścisłej kontroli, temperatura powietrza wynosiła $20,3 \pm 2,3^{\circ}\text{C}$, a wilgotność względna powietrza $50,5 \pm 6,3\%$.

Warunki przechowywania nasion miały wpływ na zachowanie zdolności kiełkowania. Udział obiektów zachowujących zdolność kiełkowania wyższą niż 75% (uwzględniając tylko siewki normalne) wynosił 90% po 2 latach w obydwu przechowalniach. Zdecydowana różnica wystąpiła po 12 latach, kiedy zdolność kiełkowania nasion przechowywanych w IUNG-PIB była poniżej 75%. Natomiast stałe warunki temperatury i wilgotności w IPK zapewniły kiełkowanie 40% badanych nasion na poziomie powyżej 75%, czyli takim, jaki jest pożądany w przechowalnictwie (rys. 4).

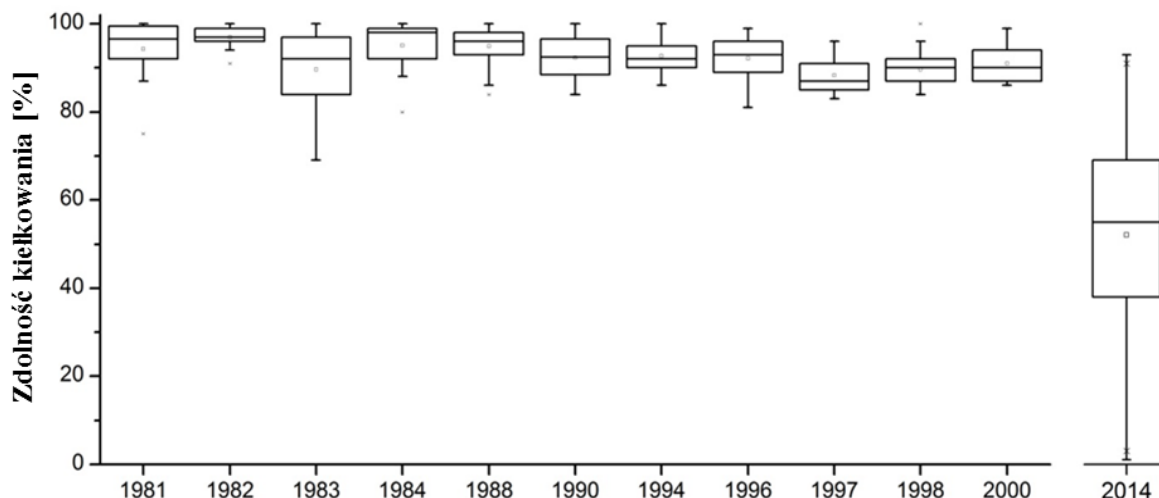
Przedstawione wyniki wskazują, że nasiona obiektów rodzaju *Nicotiana* przechowywane w warunkach niepodlegających ścisłej kontroli szybciej uległy procesom starzenia i traciły wigor. Z kolei w warunkach stałej temperatury i wilgotności powietrza proces starzenia przebiegał znacznie wolniej. Wyniki tych badań opublikowano w pracy Agackiej i in. (2013).



Rysunek 4. Udział obiektów ze zdolnością kiełkowania > 75% w zależności od warunków przechowywania nasion
a - nasiona *N. tabacum* przechowywane w warunkach niekontrolowanych b - nasiona *N. tabacum* i *N. rustica* przechowywane w stałej temperaturze i wilgotności

6.1.2. Porównanie żywotności nasion tytoniu przechowywanych w temperaturze 0°C i -18°C

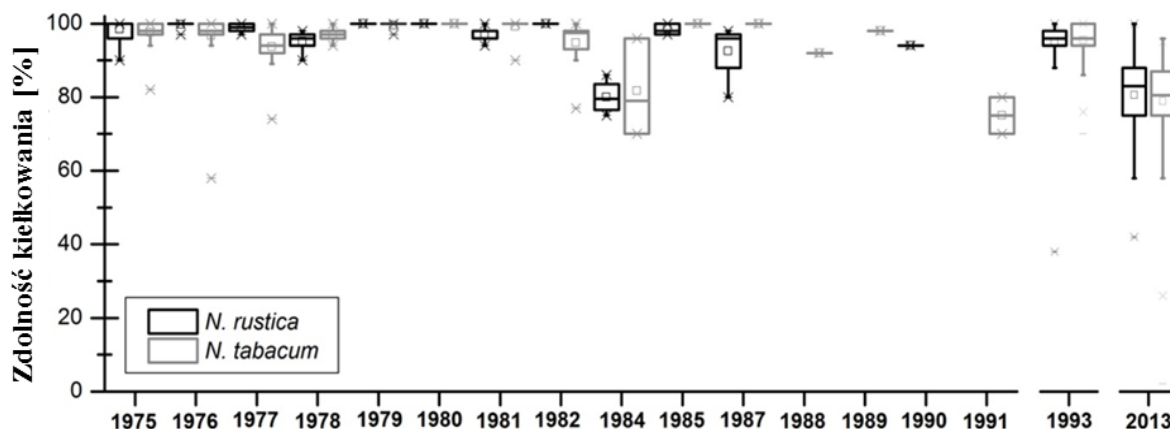
Przeprowadzono badania zdolności kiełkowania nasion przechowywanych w IHAR-PIB, gdzie temperatura wynosiła 0°C oraz przechowywanych w banku genów IPK w temperaturze -18°C. Wyjściowa zdolność kiełkowania obiektów zdeponowanych w przechowalni IHAR-PIB, wcześniej regenerowanych w IUNG-PIB w latach 1981–2000, była wysoka, z medianami w zakresie od 90 do 100%, a 25. i 75. percentyl mieścił się w zakresie od 85 do 100% (rys. 5). Testy kiełkowania przeprowadzone w 2014 roku, kiedy obiekty były przechowywane w IHAR-PIB od 14 do 33 lat w temperaturze 0°C, wykazały obniżenie zdolności kiełkowania do mediany wynoszącej około 50%, a 25. i 75. percentyl mieścił się w zakresie od 24 do 75%.



Rysunek 5. Początkowa zdolność kiełkowania obiektów *N. tabacum* regenerowanych w IUNG-PIB, a przechowywanych w IHAR-PIB w latach 1981–2000 oraz zdolność kiełkowania tych obiektów testowana w 2014 roku. Ramka jest determinowana przez 25. i 75. percentyl, poprzeczna linia określa medianę. Wąsy są determinowane przez 5. i 95. percentyl (najniższa i najwyższa wartość, która nie odstaje od pozostałych), gwiazdki przez 1. i 99. percentyl (wartość minimalna i maksymalna)

Początkowa zdolność kiełkowania obiektów regenerowanych w latach 1975–1991 w IPK była wysoka (rys. 6). Mediany w poszczególnych latach wahały się pomiędzy 90 a 100%, z wyjątkiem lat 1984 i 1991, w których wartości mediany wynosiły około 80%. Jednak w tych latach niewiele obiektów zostało zregenerowanych – 4 należące do *N. tabacum* i 3 do *N. rustica* w roku 1984 oraz 2 obiekty *N. rustica* w 1991 roku. Testy kiełkowania wykonane w 1993 roku w IPK dla przechowywanych obiektów wykazały wysoką zdolność kiełkowania. Mediany dla obu gatunków wyniosły powyżej 95%, a 25. i 75. percentyl mieściły się w zakresie od 90 do 100% (rys. 6).

Testy kiełkowania wykonane w 2013 roku, kiedy nasiona były przechowywane od 22 do 38 lat w temperaturze -18°C , wykazały, iż zdolność kiełkowania obniżyła się, niemniej jednak mediany zarówno dla *N. tabacum* jak i *N. rustica* nadal były w granicach 80%, a 25. i 75. percentyl mieściły się w zakresie od 70 do 90% (rys. 6).

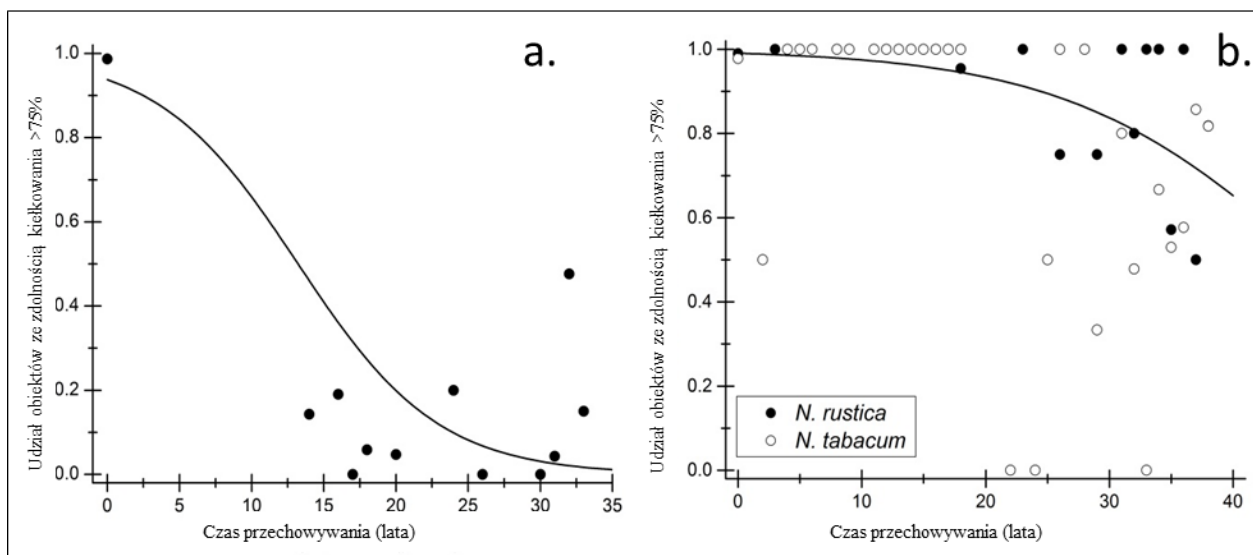


Rysunek 6. Początkowa zdolność kiełkowania obiektów *N. rustica* i *N. tabacum* regenerowanych w latach 1975–1991 w IPK oraz zdolność kiełkowania tych obiektów testowana w latach 1993 i 2013. Ramka jest determinowana przez 25. i 75. percentyl, poprzeczną linię określa mediana. Wąsy są determinowane przez 5. i 95. percentyl (najniższa i najwyższa wartość, która nie odstaje od pozostałych), gwiazdki przez 1. i 99. percentyl (wartość minimalna i maksymalna)

Nasiona testowanych obiektów charakteryzowały się wysoką wyjściową zdolnością kiełkowania wynoszącą od 90 do 100%, co oznacza, iż regeneracja materiału utrzymywanego w kolekcjach wykonana została we właściwy sposób.

Żywotność nasion badanych obiektów kolekcji *Nicotiana* obniżała się w różnym tempie w trakcie długotrwałego przechowywania w bankach genów. Test kiełkowania przeprowadzony dla obiektów kolekcji *Nicotiana* przechowywanych w temperaturze 0°C oraz -18°C wykazał znaczące różnice w żywotności nasion w zależności od zastosowanej temperatury (rys. 7). Nasiona przechowywane w temperaturze 0°C znacznie szybciej uległy procesom starzenia i traciły żywotność. Po 10 latach przechowywania w temperaturze 0°C zdolność kiełkowania powyżej 75% zachowało 70% testowanych obiektów, ale już po 33 latach liczba takich obiektów spadła poniżej 10%. Po 12 latach przechowywania udział obiektów ze zdolnością kiełkowania >75% znacząco się obniżył (rys. 7).

Nasiona przechowywane w temperaturze -18°C znacznie dłużej zachowały zdolność kiełkowania na poziomie niewymagającym regeneracji. Około 90% testowanych obiektów z kolekcji *Nicotiana* przechowywanych przez 20 lat w temperaturze -18°C zachowało zdolność kiełkowania powyżej 75%, a po 38 latach przechowywania zdolność kiełkowania powyżej 75% zachowało blisko 60% badanych obiektów. Wyniki opublikowano w pracy Agackiej i in. (2014).



Rysunek 7. Udział obiektów ze zdolnością kiełkowania > 75% w zależności od warunków przechowywania. a - nasiona *N. tabacum* przechowywane w temperaturze 0°C; b - nasiona *N. tabacum* i *N. rustica* przechowywane w temperaturze -18°C

6.2. Identyfikacja QTL dla cech związanych z długością życia nasion

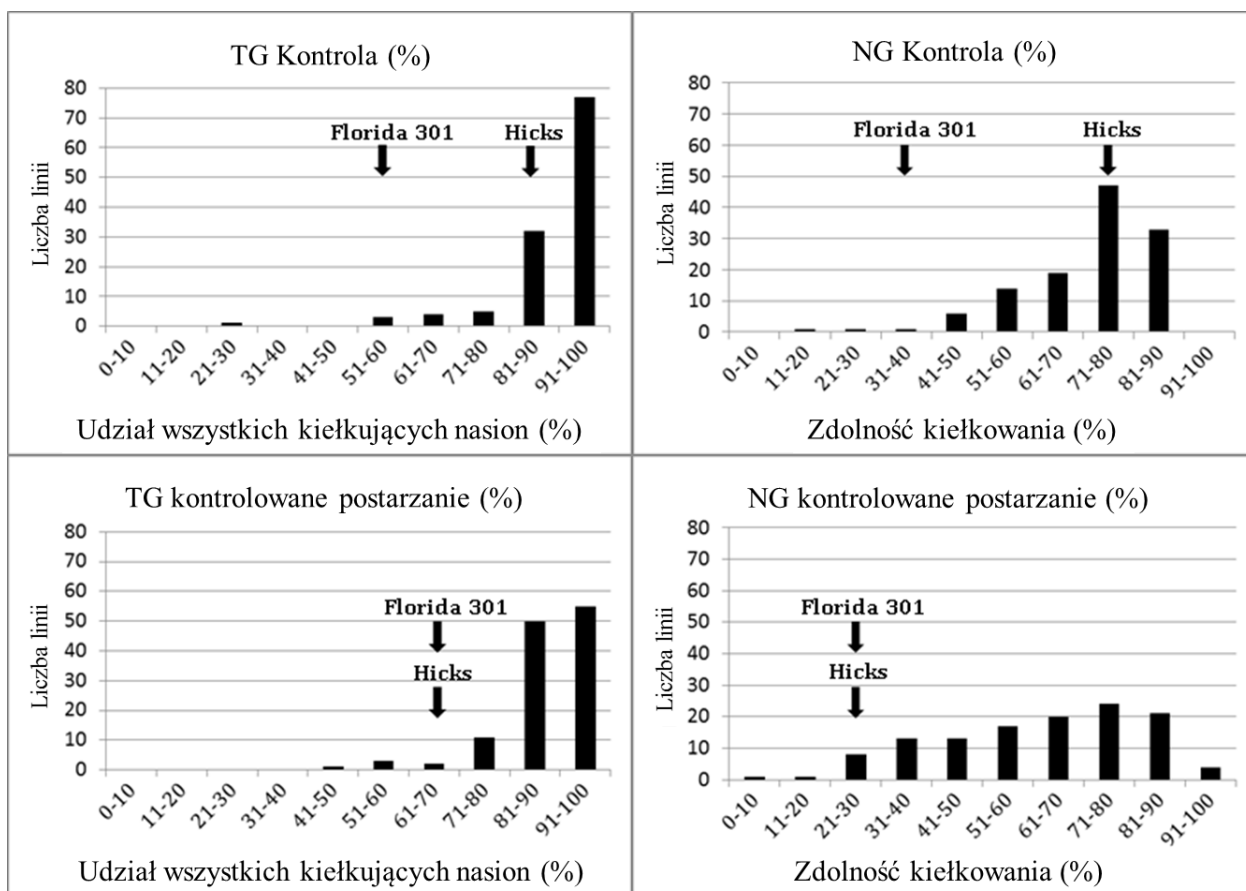
6.2.1. Charakterystyka fenotypowa populacji RIL Florida 301 × Hicks

Cechy ilościowe charakteryzuje zmienność ciągła, ponieważ wiele genów o niewielkim pojedynczym wpływie bierze udział w kształtowaniu danej cechy. Rozkład cech ilościowych często jest normalny lub zbliżony do normalnego, ponieważ różnice pomiędzy fenotypami są niewielkie. Dlatego wartości cechy w populacji przyjmują szeroki zakres i nie tworzą wyraźnych klas jak w przypadku cech jakościowych. W związku z tym, przed przystąpieniem do określenia sposobu dziedziczenia danej cechy i wyboru odpowiednich metod, należy ocenić charakter zmienności badanej cechy.

Rozkład badanych cech fenotypowych (zdolność kiełkowania, liczba skielkowanych nasion, czas potrzebny do skielkowania 50% nasion w próbie, parametr AUC) w populacji RIL jak i dla osobników rodzicielskich przedstawiono na rys. 8 i 9.

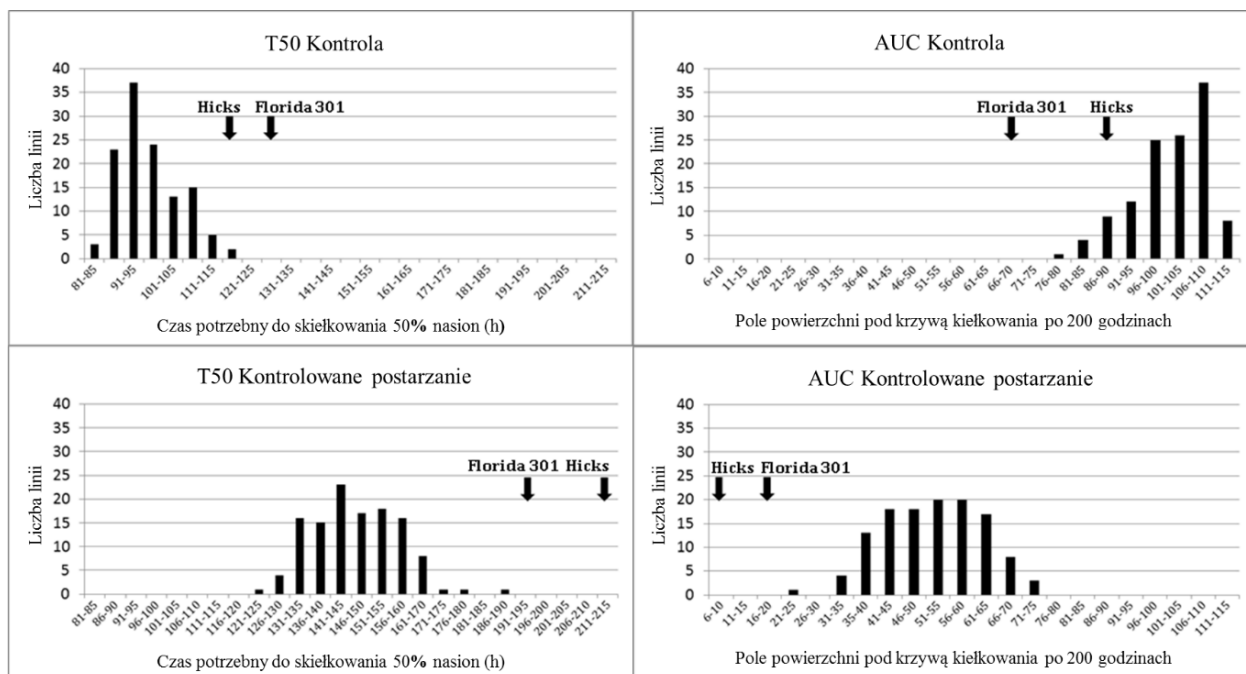
Bezpośrednie porównanie cech kiełkowania rodziców i potomstwa nie było możliwe, ponieważ nasiona osobników rodzicielskich regenerowano w innym roku niż potomstwa, dlatego też oceniano rodziców i potomstwo osobno. Nasiona kontrolne odmiany Hicks charakteryzowały się wyższą zdolnością kiełkowania w porównaniu z odmianą Florida 301 (rys. 8). Natomiast w teście sztucznego starzenia Florida 301 okazała się bardziej tolerancyjna

na stres związany z postarzaniem w stosunku do odmiany Hicks, dla której udział procentowy nasion normalnie kiełkujących znacznie się obniżył w porównaniu do nasion kontrolnych niepostarzanych.



Rysunek 8. Charakterystyka rozkładu cech w populacji RIL Florida 301 × Hicks dla nasion kontrolnych i nasion poddanych sztucznemu starzeniu. Cechy wyrażone procentowo: udział wszystkich kiełkujących nasion (%TG) i zdolność kiełkowania (%NG). Pozycje rodziców na tle potomstwa oznaczono strzałkami.

Podobne wyniki zaobserwowano badając parametry opisujące szybkość kiełkowania takie jak: T50 i AUC (rys. 9). Nasiona kontrolne odmiany Hicks kiełkowały szybciej (niższe T50), osiągając wyższe wartości parametru AUC w porównaniu do odmiany Florida 301. Jednak po zastosowaniu warunków stresowych w teście kontrolowanego starzenia, wyniki uzyskane dla odmian rodzicielskich uległy odwróceniu, co ponownie wskazuje, że nasiona odmiany Florida 301 charakteryzowały się wyższą żywotnością (rys. 9).



Rysunek 9. Charakterystyka rozkładu cech T50 i AUC w populacji RIL Florida 301 × Hicks dla nasion kontrolnych i nasion poddanych sztucznemu starzeniu. Pozycje rodziców na tle potomstwa oznaczono strzałkami.

Rozkład cech związanych z żywotnością nasion w populacji RIL, zarówno w przypadku obiektu kontrolnego jak i po teście kontrolowanego starzenia, wyraźnie wskazuje na ilościowe dziedziczenie badanych cech.

Wpływ warunków stresowych był bardziej widoczny dla cech związanych z szybkością kiełkowania, ponieważ zaobserwowano znaczący wzrost wartości T50 i obniżenie wartości AUC w nasionach postarzanych.

6.2.2. Identyfikacja QTL w populacji RIL Florida 301 × Hicks dla cech związanych z żywotnością nasion

W wyniku mapowania QTL wykryto siedem głównych QTL i dwa o mniejszym znaczeniu na czterech chromosomach dla badanych cech związanych z żywotnością nasion tytoniu w populacji RIL Florida 301 × Hicks (rys. 10, tab. 3).

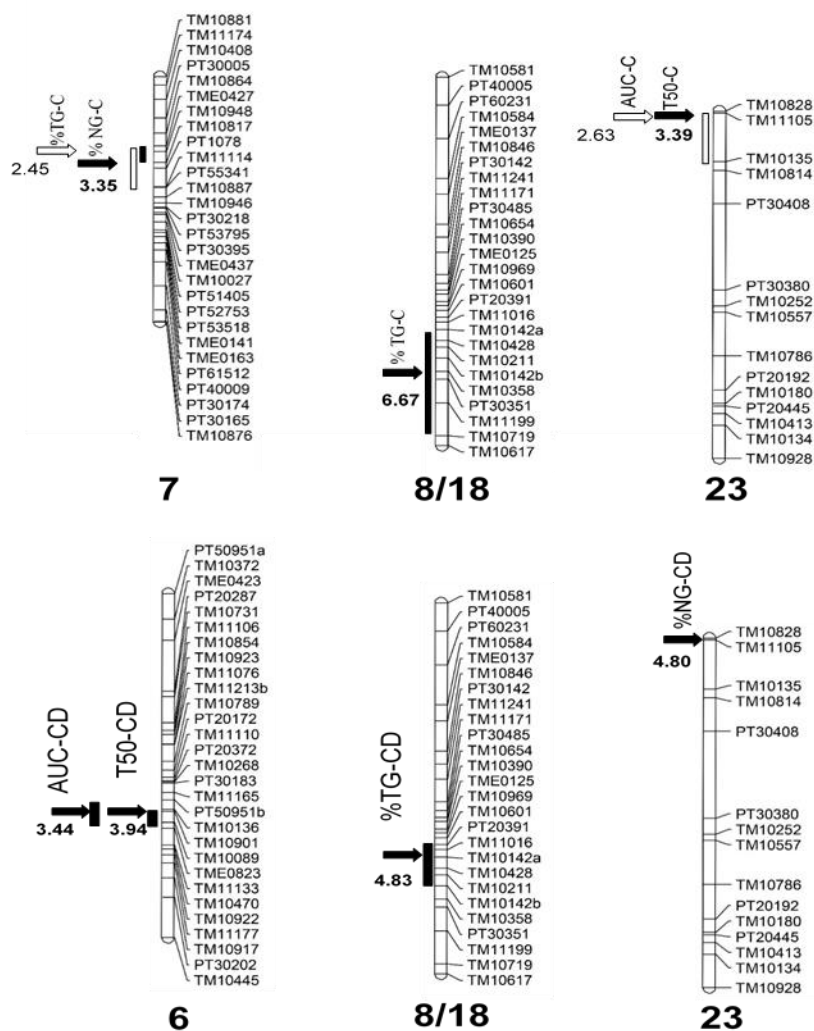
Tabela 3. Charakterystyka QTL dla analizowanych cech: liczba kiełkujących nasion (%TG–C, %TG–CD), zdolność kiełkowania (%NG–C, %NG–CD), czas potrzebny do skielkowania 50% nasion w próbie (T50–C, T50–CD) oraz pole powierzchni pod krzywą po 200 h kiełkowania (AUC–C, AUC–CD) dla nasion kontrolnych (C) i nasion sztucznie postarzanych (CD)

QTL	Chromosom	Marker najbliżej położony	Pozycja markeru na chromosomie (cm)	LOD	R ² (%)	Rodzic będący donorem allelu pozytywnie kształtującego cechę
%TG–C	8/18	TM10358	78,24	6,67	18,3	Hicks
T50–C	23	TM11105	0,467	3,39	12,3	Florida 301
%NG–C	7	TM10817	22,832	3,35	9,5	Florida 301
AUC–C	23	TM11105	0,467	2,63	8,1	Hicks
%TG–C	7	TM10948	19,898	2,45	7,0	Florida 301
%TG–CD	8/18	TM10142a	67,06	4,83	13,3	Hicks
%NG–CD	23	TM11105	0,467	4,80	12,9	Florida 301
T50–CD	6	TM10901	57,462	3,94	11,1	Hicks
AUC–CD	6	TM10901	57,462	3,44	9,2	Florida 301

W nasionach obiektów kontrolnych najwyższą wartość LOD (6,67) odnotowano dla QTL związanego z liczbą skielkowanych nasion (%TG). Jest on położony na chromosomie 8/18 i odpowiada za 18,3% zmienności dla tej cechy. Korzystny allel w tym regionie pochodził od odmiany Hicks. Ponadto wykryto QTL wpływający na zdolność kiełkowania (%NG) zlokalizowany na chromosomie 7, wraz z QTL dla liczby skielkowanych nasion (%TG). W obu przypadkach korzystne allele warunkujące żywotność nasion zostały wniesione przez odmianę Florida 301. Dla nasion kontrolnych wykryto QTL dla cech T50 i AUC, zidentyfikowane w tych samych pozycjach na chromosomie 23.

W nasionach sztucznie postarzanych locus o najwyższym LOD (4,83) został ponownie wykryty dla liczby skielkowanych nasion i zlokalizowany na chromosomie 8/18 w podobnej pozycji jak w przypadku nasion kontrolnych. Region ten odpowiada za 13,3% zmienności fenotypowej, a allel pochodzi od odmiany Hicks. Na chromosomie 23 zidentyfikowano QTL

determinujący zdolność kiełkowania (%NG) wnoszony przez odmianę Florida 301, a znajdujący się w zbliżonej pozycji do locus determinującego szybkość kiełkowania dla nasion kontrolnych. Region kontrolujący szybkość kiełkowania (T50 i AUC) w nasionach sztucznie postarzanych wykryto na chromosomie 6 (rys. 10). Duża szybkość kiełkowania (charakteryzowana przez niskie T50 i wysoką wartość AUC) była warunkowana przez odmianę rodzicielską Florida 301. Wyniki przedstawiono w publikacji Agackiej i in. (2015).



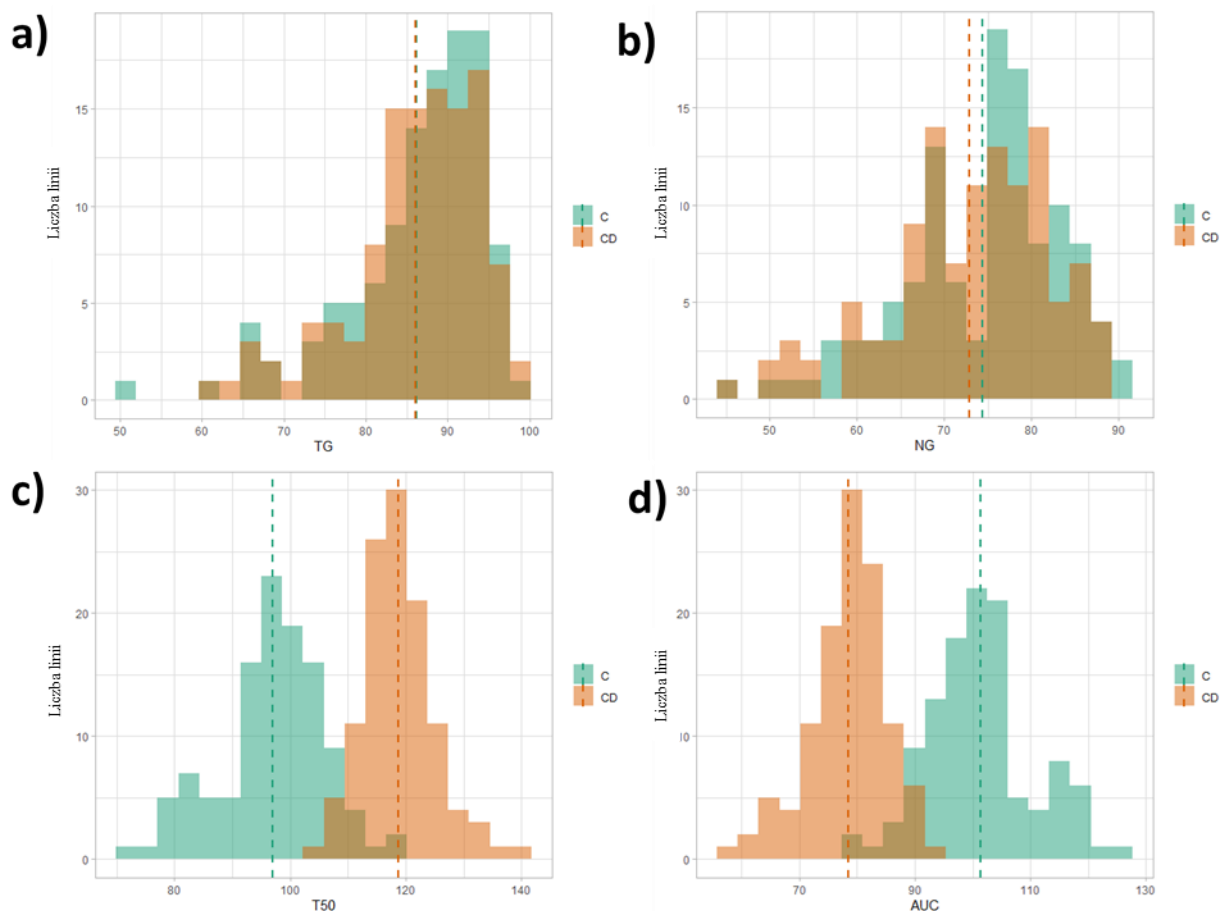
Rysunek 10. Lokalizacja QTL kontrolujących cechy związane z żywotnością nasion tytoniu. QTL dla nasion kontrolnych (C) i dla nasion postarzanych (CD) dla cech: liczba skielkowanych nasion (%TG-C, %TG-CD), zdolność kiełkowania (%NG-C, %NG-CD), czas potrzebny do skielkowania 50% nasion w próbie (T50-C, T50-CD) oraz pole powierzchni pod krzywą czasu kiełkowania, po 200 h kiełkowania (AUC-C, AUC-CD). Wartości LOD podano pod strzałką

6.2.3. Charakterystyka fenotypowa populacji DH Beinhart–1000 × Hicks

Wszystkie badane cechy (liczba skielkowanych nasion, zdolność kiełkowania, czas potrzebny do skielkowania 50% nasion w próbie, parametr AUC) w populacji podwojonych haploidów otrzymanych z krzyżowania Beinhart–1000 × Hicks charakteryzowała zmienność ciągła, co wykazano za pomocą analizy wariancji (rys. 11). Odmiany Beinhart–1000 i Hicks różniły się nieznacznie pod względem liczby skielkowanych nasion osiągając odpowiednio 87,9% i 93,5%. Natomiast sztuczne postarzanie nasion obniżyło wartości dla tej cechy odpowiednio do 83,5% i 84,2%. W przypadku szybkości kiełkowania różnice były bardziej wyraźne. Wartości dla cechy AUC wynosiły 88,3 i 108,3 odpowiednio dla odmian Beinhart–1000 i Hicks w przypadku nasion kontrolnych oraz 80,2 i 89,4 dla nasion sztucznie postarzanych.

Widoczna w rozkładzie skośność w prawą stronę dla cech TG i NG wskazuje, że początkowa zdolność kiełkowania nasion była bardzo wysoka (rys. 11) i zabieg sztucznego postarzania nie wpłynął na średnie wartości tych cech.

Z drugiej strony, rozkład wartości dla cech T50 i AUC był zbliżony do normalnego, przy czym wartości T50 były znacznie wyższe po zastosowaniu metody sztucznego postarzania w przeciwieństwie do cechy AUC, której wartości zmalały. Rozkład cech zbliżony do normalnego wskazuje, iż wiele genów uczestniczy w wytworzeniu cechy fenotypowej. Umożliwia to przeprowadzenie identyfikacji QTL pod kątem potencjalnych *loci* warunkujących te cechy.



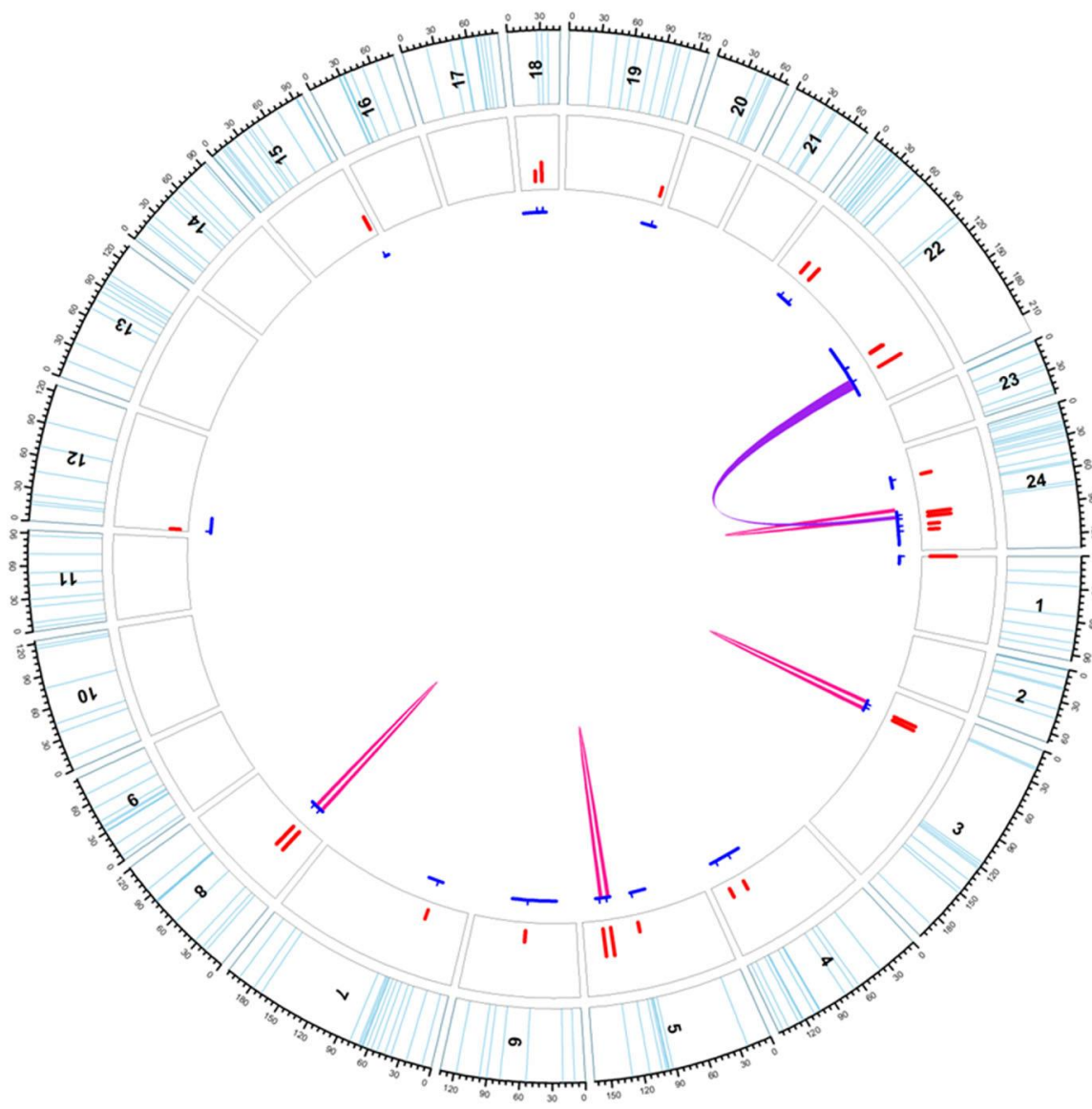
Rysunek 11. Rozkład cech fenotypowych: TG (a), NG (b), T50 (c) i AUC (d) dla nasion kontrolnych (zielony) i dla nasion sztucznie postarzanych (pomarańczowy) w populacji Beinhart–1000 × Hicks. Przerywane linie oznaczają wartości średnie dla poszczególnych cech. Kolor brązowy oznacza wartości nakładające się.

6.2.4. Identyfikacja QTL w populacji DH Beinhart–1000 × Hicks dla cech związanych z żywotnością nasion

W wyniku zastosowania integracyjnego złożonego mapowania interwałowego wykryto 23 QTL o działaniu addytywnym, rozmieszczone na 11 chromosomach (1, 4, 5, 6, 7, 12, 15, 18, 19, 22), kontrolujące zmienność 4 badanych cech związanych z żywotnością nasion tytoniu (rys. 13, tab. 4).

Tabela 4. Charakterystyka QTL o działaniu addytywnym i epistatycznym dla nasion kontrolnych (C) i sztucznie postarzanych (CD) dla cech: liczba skielkowanych nasion (%TG–C, %TG–CD), zdolność kiełkowania (%NG–C, %NG–CD), czas potrzebny do skielkowania 50% nasion w próbie (T50–C, T50–CD) oraz pole powierzchni pod krzywą czasu kiełkowania po 200 h kiełkowania (AUC–C, AUC–CD)

Cecha	Liczba wykrytych QTL	Chromosom	LOD	R ² (%)
QTL addytywne				
TG–C	3	6,22,24	2,01–3,4	7,17–13,53
TG–CD	2	1,22	2,89–3,08	11,52–12,32
NG–C	2	7,24	2,2–2,29	8,63–9,41
NG–CD	-	-		
AUC–C	6	4,12,15,18,22,24	2–4,18	3,29–18,76
AUC–CD	1	19	2,03	7,5
T50–C	6	4,12,15,18,22,24	2–4,18	3,29–18,76
T50–CD	3	5,18,24	2,05–2,33	3,8–7,97
QTL epistatyczne				
TG–C	4 pary	3–3, 5–5, 8–8, 24–24	5,12–6,20	6,47–7,55
TG–CD	1 para	22–24	5,7	22,13



Rysunek 12. Rozmieszczenie QTL addytywnych (niepołączone niebieskie linie w wewnętrznym kole) i epistatycznych (połączone niebieskie linie w wewnętrznym kole). Niebieskie linie w zewnętrznym torze wskazują pozycje markerów na każdym chromosomie; czerwone linie w drugim okręgu to wartości LOD dla poszczególnych QTL. Niebieskie linie pod okręgiem wyznaczają przedział ufności QTL, a małe pionowe linie - pozycję szczytową. Kolorowe linie łączą różne bialleliczne epistatyczne regiony QTL (różowe - TG dla nasion kontrolnych; fioletowe - TG dla nasion po sztucznym postarzeniu)

Cechy AUC-C i T50-C były kontrolowane przez sześć QTL rozmieszczonych na chromosomach 4, 12, 15, 18, 22 i 24 (LOD od 2,02 do 4,18). Natomiast współczynnik determinacji (R^2), który określa procentowy udział zmienności cech (PVE – phenotypic variation explanation) kontrolowanych przez zidentyfikowane QTL, zawierał się w przedziale

3,29–18,76. Wszystkie sześć QTL dla cech AUC–C, jak i T50–C nakładały się na siebie z podobnymi wartościami LOD i PVE. Co ciekawe, cechy te były wnoszone przez różnych rodziców.

W nasionach kontrolnych dla liczby skielkowanych nasion (TG%) wykryto 3 QTL zlokalizowane na chromosomach 6, 22 i 24 (LOD od 2,01 do 3,4; PVE od 7,17 do 13,53), podczas gdy dla cechy zdolność kiełkowania (NG%) dwa QTL położone na chromosomie 7 i 24 (LOD od 2,2 do 2,29; PVE od 8,63 do 9,41). Na chromosomie 24 QTL dla cech TG–C i NG–C nakładały się na siebie.

W przypadku nasion poddanych procedurze kontrolowanego starzenia dla liczby skielkowanych nasion (TG–CD) zidentyfikowano dwa QTL zlokalizowane na chromosomach 1 i 22 (LOD od 2,89 do 3,08; PVE od 11,52 do 12,32), których obecność wyjaśniała łącznie 24% zmienności fenotypowej dla tej cechy. Ponadto na chromosomach 5, 18 i 24 zidentyfikowano po 1 QTL, które związane są z cechą szybkość kiełkowania opisaną czasem potrzebnym do skielkowania 50% nasion w próbie (T50–CD) (LOD od 2,05 do 2,33; PVE od 3,8 do 7,97). Tylko jeden QTL położony na chromosomie 19 został wykryty dla cechy AUC (LOD - 2,03; PVE - 7,5). Nie udało się natomiast wykryć QTL dla zdolności kiełkowania (NG%) (tab. 5, rys. 11).

QTL o działaniu epistatycznym udało się wykryć tylko dla cechy liczba skielkowanych nasion (TG%). Dla nasion kontrolnych wykryto cztery pary QTL zlokalizowane na chromosomach 3, 5, 8 i 24. Dla tej cechy zidentyfikowano również jedną parę zlokalizowaną na chromosomach 22 i 24 w nasionach sztucznie postarzanych. Występowanie czterech par QTL związanych z cechą TG–C o wartościach LOD pomiędzy 5,12 a 6,20 wyjaśniało dodatkowo 6,47–7,55% zmienności dla tej cechy, podczas gdy jedna para związana z cechą TG–CD o wartości LOD=5,7 odpowiadała za 22,13% zmienności (tab. 5, rys. 11). Wyniki opisano bardziej szczegółowo w publikacji Agackiej i in. (2021).

5. Dyskusja

Informacje dotyczące żywotności nasion danego gatunku odgrywają kluczową rolę w ochronie zasobów genowych. Pozwalają wyznaczyć okres przechowywania nasion w stanie żywym oraz określić potrzebę ich regeneracji. W literaturze nie ma zbyt wielu pozycji mówiących o żywotności nasion starzejących się naturalnie podczas przechowywania w bankach genów. Większość prac dotyczy nasion poddanych różnym procedurom sztucznego postarzania.

W przedstawionej rozprawie doktorskiej oceniano żywotność nasion różnych obiektów (odmian) gatunku *Nicotiana tabacum* i gatunku *Nicotiana rustica* przechowywanych w bankach genów IPK i IHAR-PIB oraz w IUNG-PIB. W zależności od lokalizacji nasiona były przechowywane w różnych zakresach temperatury, tj. 18–22°C, 0°C lub w -15/-18°C.

W przypadku przechowywania nasion rodzaju *Nicotiana* w kolekcjach aktywnych w IUNG-PIB i IPK zastosowano zbliżone do siebie wartości temperatury (odpowiednio 18–22°C i 20°C), ale odmienną wilgotność względną powietrza. W IPK względna wilgotność powietrza była kontrolowana i wynosiła 50%, podczas gdy w IUNG-PIB parametr ten nie był stały i wilgotność powietrza w pomieszczeniu z szafami nasiennymi wahała od 40% do 65%. Zaobserwowano duże różnice w żywotności nasion badanych obiektów przechowywanych przez okres 12 lat w IPK i w IUNG-PIB. Nasiona obiektów rodzaju *Nicotiana* przechowywane w IUNG-PIB szybciej ulegały procesom starzenia i po 11 latach ich zdolność kiełkowania spadła poniżej 75%. Natomiast w IPK proces starzenia nasion przebiegał znacznie wolniej, przez co 40% badanych obiektów zachowało zdolność kiełkowania powyżej 75%. Wynik ten ma istotne znaczenie, ponieważ zdolność kiełkowania wynoszącą 75% przyjęto za próg, poniżej którego nasiona przechowywane w banku genów należy regenerować (standard regeneracji w banku genów w IPK).

Spośród czynników abiotycznych wilgotność, temperatura i tlen mają największe znaczenie w trakcie przechowywania nasion (Ellis i Roberts, 1980; Ellis i in., 1988; Ellis i in., 1989; Ellis i Hong, 2007). Zarówno w IPK jak i w IUNG-PIB nasiona były przechowywane w papierowych torebkach z dostępem tlenu i w zbliżonej temperaturze. Jednak stały poziom wilgotności względnej powietrza zachowano wyłącznie w przechowalni IPK. Można zatem wnosić, że sezonowe wahania wilgotności powietrza miały decydujący wpływ na zmniejszenie żywotności przechowywanych w IUNG-PIB nasion i szybszą utratę ich wigoru.

Wyższa wilgotność powietrza powoduje wzrost wilgotności nasion, co z kolei sprzyja ich szybszemu starzeniu się. Reguła Harringtona (1963) mówi, iż zredukowanie wilgotności nasion o 1% i temperatury przechowywania o 5°C wydłuża dwukrotnie czas życia nasion. Nasiona z natury są higroskopijne i pochłaniają wilgoć z otoczenia. Przy użyciu modułu dostępnego na stronach Royal Botanic Garden Kew w pracy Agackiej i in. (2013) dokonano szacunku wilgotności nasion tytoniu na podstawie temperatury przechowywania i wilgotności względnej powietrza. Wilgotność nasion zdeponowanych w IUNG-PIB oszacowano na 10,9%, a w IPK na 7,8%. O wpływie zróżnicowanej bardzo niskiej wilgotności nasion (od 2% do 9%) na ich kiełkowanie donoszą Singh i in. (2016). Testowali oni nasiona różnych gatunków roślin (ciecierzycy, sezamu, olejarki abisyńskiej, rącznika pospolitego, krokosza barwierskiego) przechowywane przez okres 16–18 lat w różnej temperaturze: pokojowej, +4°C i -18°C. Nasiona wszystkich testowanych gatunków wykazały najwyższą zdolność kiełkowania przy najniższej zawartości wody w nasionach przechowywanych w temperaturze pokojowej lub w +4°C. Nasiona o zawartości wody 3,2–5% utraciły zdolność kiełkowania po 8–10 latach przechowywania. Tymczasem obniżenie zawartości wody do 1,7–2,3% wydłużyło ten okres, a zdolność kiełkowania nasion większości gatunków po 18 latach wynosiła 86–94%. Wyjątek stanowiły nasiona rącznika, których zdolność kiełkowania była na poziomie tylko 36%.

Hong i in. (2005) odnotowali podobną zależność. Po 10 latach hermetycznego przechowywania w temperaturze 20°C stwierdzono większą przeżywalność ultra suchych nasion marchwi, orzeszków ziemnych, rzepaku, sałaty i cebuli w porównaniu z nasionami określanymi jako suche. Z kolei Ellis i Hong (2006) wykonali badania dotyczące żywotności nasion *Medicago sativa* i *Trifolium pratense* przechowywanych przez 15 lat w szerokim zakresie temperatur (65°C, 50°C, 40°C, 30°C, -20°C) przy wilgotności nasion w zakresie 2–15%. Wykazali, iż żywotność nasion przechowywanych w dodatnich temperaturach pozostawała wysoka, jeśli wilgotność nasion była niska, tj. na poziomie 4–6%. Tylko w temperaturze -20°C poziom wilgotności nasion nie miał takiego znaczenia. Podobne wyniki uzyskali Ali i in. (2019) badając żywotność nasion soi, których wilgotność początkowa wynosiła 6%, 8%, 10% lub 12%. Nasiona te znajdowały się w dwóch rodzajach pojemników – worek polietylenowy lub szklany słoik i były przetrzymywane w pomieszczeniu, w którym temperatura wahała się od 16°C do 30°C, a wilgotność powietrza była stosunkowo wysoka, bo od 75,21% do 86,23%. Zawartość wody w nasionach, zdolność kiełkowania i wskaźnik wigoru

mierzono po 50, 100, 150 i 200 dniach przechowywania. Nasiona przechowywane w workach polietylenowych lub szklanych słoikach wykazały podobne wyniki w zakresie kiełkowania i wskaźnika wigoru, co świadczy że w równym stopniu chroniły przed dostępem wilgoci. Nasiona o wilgotności 6 i 8% zachowały zdolność kiełkowania powyżej 80% po 200 dniach przechowywania. Natomiast nasiona o najwyższej wilgotności niezależnie od zastosowanego pojemnika, charakteryzowały się znacząco obniżoną zdolnością kiełkowania. Po 200 dniach zdolność kiełkowania wynosiła od 6 do 27% w zależności od genotypu.

Ciekawe badania przeprowadzili także Probert i in. (2007). Co prawda dotyczą one wpływu temperatury i wilgotności powietrza panujących nie w trakcie przechowywania a w trakcie zbioru nasion. Wskazują jednak wyraźnie, że ważniejsze jest kontrolowanie wilgotności powietrza, a tym samym wilgotności nasion, niż temperatury, w jakiej prowadzony jest zbiór. Ponadto pokazują, że prognozowane tempo utraty wigoru nasion zebranych w temperaturze 31,4°C i wilgotności względnej powietrza 24,5% będzie 37 razy mniejsze niż nasion zebranych w tej samej temperaturze, ale przy wilgotności powietrza wynoszącej 72,5%. Badania te potwierdzają regułę zaproponowaną przez Roberta i Ellisa (1981), iż długość życia nasion podwaja się w przybliżeniu na każde 10% obniżenia wilgotności względnej powietrza.

W ostatnich latach prowadzono wiele badań mających na celu zrozumienie wpływu zawartości wody w nasionach i temperatury przechowywania na długość życia nasion. Niska temperatura i niska zawartość wody powodują, że lepkość cytoplazmy osiąga tak wysokie wartości, że tworzy ona stan szklisty. Wysoka lepkość cytoplazmy zmniejsza mobilność molekularną i utrudnia dyfuzję związków w cytoplazmie spowalniając w ten sposób szkodliwe reakcje i zmiany w strukturze i składzie chemicznym. To z kolei ogranicza procesy degradacji i skutkuje wydłużeniem żywotności nasion (Buitnik i Lepriece, 2000).

Podczas starzenia się nasion następuje wiele zmian, w tym utrata integralności błony komórkowej, nagromadzenie wolnych rodników, zmiany w ekspresji genów, utrata funkcji mitochondriów. Zmiany te mogą prowadzić do różnych zmian biochemicznych, w tym peroksydacji lipidów, utleniania białek, zmian w metabolizmie cukrów, zmian w poziomie hormonów. Ponadto podczas starzenia się nasion mogą wystąpić zmiany molekularne, w tym uszkodzenia DNA, zmiany w ekspresji genów, zmiany w strukturze i funkcji białek, zmiany w systemie antyoksydacyjnym, metylacja DNA i modyfikacje chromatyny (Nadarajan i in., 2023; Zhang i in., 2020). Niekorzystne zmiany na poziomie molekularnym i komórkowym wpływają

na procesy starzenia i w konsekwencji na obniżenie zdolności kiełkowania nasion oraz na zwiększający się udział siewek nienormalnych w testowanej próbie. Prawdopodobnie w nasionach tytoniu przechowywanych w wysokiej wilgotności powietrza zaszło wiele niekorzystnych zmian spośród wymienionych wyżej, co przełożyło się na szybszą utratę zdolności kiełkowania i dużym odsetkiem nasion nienormalnych w porównaniu z nasionami przechowywanymi w stałych warunkach temperatury i wilgotności.

Wyniki przedstawione w pracy Agackiej i in. (2013) również wskazują na potrzebę kontrolowania wilgotności powietrza podczas przechowywania nasion tytoniu w temperaturze pokojowej. Jeśli nie ma odpowiedniego systemu umożliwiającego utrzymanie temperatury i wilgotności na pożądanym poziomie, Probert i in. (2007) sugerują stosowanie adsorbentów wilgoci w pomieszczeniach, w których przechowuje się nasiona, aby zminimalizować niekorzystny wpływ wysokiej wilgotności powietrza na jakość nasion.

Wilgotność jest istotnym czynnikiem w przechowywaniu nasion, ale równie ważna jest temperatura. Bowiem nawet gdy zachowane zostaną warunki zapewniające niską wilgotność przechowywanych nasion, ich żywotność obniża się wraz ze wzrostem temperatury panującej w przechowalni. Dzieje się tak, ponieważ wzrost temperatury zwiększa szybkość reakcji chemicznych w nasionach inicjując starzenie (Hartmann-Filho i in., 2016). Ponadto cieplejsze powietrze zwiększa dostępność wody dla nasion w porównaniu z zimnym powietrzem, nawet gdy wilgotność względna jest utrzymywana na stałym poziomie (Copeland i McDonald, 2012). Gdy temperatura spada poniżej 0°C, szereg reakcji biochemicznych związanych ze starzeniem się nasion jest spowolniony (Walters i in., 2010). Zalecaną temperaturą długoterminowego przechowywania nasion typu orthodox w bankach genów jest -18°C (FAO, 2014).

W niniejszej rozprawie doktorskiej duże różnice wykazano również przy porównaniu żywotności nasion tytoniu przechowywanych długoterminowo w bankach genów w IHAR-PIB i IPK z zastosowaniem różnych temperatur: 0°C i -18°C oraz bez dostępu, jak i z dostępem powietrza (Agacka i in., 2014). Wyjściowa zdolność kiełkowania wszystkich badanych obiektów była wysoka, co znaczy, iż regeneracja materiałów zgromadzonych w obu kolekcjach została wykonana w sposób właściwy. Wilgotność nasion w IHAR-PIB wynosiła 6%, a w IPK 4%. Badania wykazały, że po 40 latach przechowywania nasion w -18°C około 50% obiektów zachowała zdolność kiełkowania powyżej 75%. Tymczasem w temperaturze 0°C tak wysoką

zdolność kiełkowania wykazało niecałe 10% badanych obiektów, pomimo tego, iż nasiona charakteryzowały się niską zawartością wody i zamykane były próżniowo (Agacka i in., 2014).

Pakowanie próżniowe, a tym samym brak dostępu tlenu do przechowywanych nasion, wydłuża okres, w którym zachowują żywotność (Groot i in, 2012). Wiadomo, że tlen wpływa niekorzystnie na żywotność nasion powodując wiele zmian przyspieszających starzenie. Barzali i in. (2005) porównywali wpływ różnych składników atmosfery (próżnia, N₂, powietrze, CO₂) i zakresów temperatury (-15°C, 0°C, +10°C) na żywotność nasion żyta (*Secale cereale* L.). Wykazali, że po 26 latach przechowywania zdolność kiełkowania była najwyższa w warunkach próżni i N₂ w przeciwieństwie do powietrza i CO₂. W dodatku kiełkowanie nasion przechowywanych w próżni w temperaturze 10°C i -18°C było na podobnym poziomie, tj. odpowiednio 57% i 59%, podczas gdy w temperaturze 0°C zdolność kiełkowania obniżyła się do 29%. Natomiast przy dostępie powietrza zdolność kiełkowania przechowywanych nasion była wyższa w temperaturze 0°C w porównaniu z 10°C.

Również Ellis i Hong (2007) stwierdzili, że żywotność nasion przechowywanych w hermetycznie zamkniętych opakowaniach z folii aluminiowej była wyższa w porównaniu z systemem otwartym wspomagany związkami osuszającymi powietrze.

W badaniach stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej nie testowano wpływu obu czynników jednocześnie. Dlatego nie można stwierdzić, czy samo przechowywanie nasion *Nicotiana* w próżni zwiększyłoby ich długowieczność. Hay i in. (2013) przedstawili dane uzyskane dla nasion ryżu przechowywanych w warunkach hermetycznych z próżnią w temperaturze -20°C i hermetycznych bez próżni w temperaturze 2–4°C. Autorzy stwierdzili, że choć nie mogą bezpośrednio porównać wpływu pakowania próżniowego, to nie wydaje się, by któryś z systemów w większym stopniu wpłynął na zachowanie żywotności nasion.

Z kolei Specht i Börner (1998) porównali żywotność nasion żyta przechowywanych przez rok oraz 5, 15 i 17 lat w temperaturze -15°C, 0°C i 10°C z dostępem powietrza, CO₂, N₂ i w próżni. Po 17 latach przechowywania w -15°C odnotowano niewielki wpływ zastosowanej atmosfery na żywotność, niemniej zdolność kiełkowania nasion z dostępem powietrza była niższa niż w innych wariantach. Zdolność kiełkowania nasion przechowywanych przez 17 lat w 0°C była niższa niż tych przechowywanych w -15°C we wszystkich wariantach atmosfery. Największe różnice pomiędzy temperaturą 0°C i -15°C odnotowano dla nasion

przechowywanych z dostępem powietrza i w próżni. Zdolność kiełkowania nasion przechowywanych w 0°C obniżyła się o połowę w porównaniu z tymi przechowywanymi w -15°C.

Desheva (2016) oceniła zdolność kiełkowania 117 obiektów *Nicotiana tabacum* przechowywanych przez okres 22 lat w temperaturze -18°C w banku genów w Bułgarii. Po 13 latach przechowywania odnotowano niewielkie obniżenie zdolności kiełkowania z 97% do 93%, a po 22 latach zdolność kiełkowania testowanych obiektów wyniosła 90±13%. Wyniki te są zgodne z otrzymanymi w pracy Agackiej i in. (2014), gdzie żywotność nasion *Nicotiana* podczas 20 lat przechowywania w temperaturze -18°C nie uległa dużej zmianie i 90% testowanych obiektów zachowała zdolność kiełkowania powyżej 75%.

Odminną tendencję odnotowali Dobiesz i in. (2017) w przypadku nasion łubinu przechowywanych w temperaturze 0°C, -14°C i +20°C. Nie zaobserwowano różnic w żywotności nasion przechowywanych w temperaturze 0°C i -14°C przez 29 lat. Ich zdolność kiełkowania wynosiła odpowiednio 92% i 94%, natomiast nasiona przechowywane w +20°C nie kiełkowały. Utrzymanie wysokiej żywotności nasion łubinu wynika prawdopodobnie z faktu, iż nasiona roślin bobowatych są, jak się uważa, stosunkowo długo żyjące.

A zatem głównym czynnikiem różnicującym żywotność nasion pomiędzy zdeponowanymi w IHAR-PIB a tymi w IPK wydaje się być temperatura przechowywania. Zastosowanie próżni w temperaturze 0°C nie przyczyniło się dodatkowo do wydłużenia żywotności nasion (Agacka i in., 2014).

Podsumowując wyniki uzyskane w prezentowanych dwóch publikacjach (Agacka i in. 2013 oraz Agacka i in. 2014) można wnioskować, iż głównym czynnikiem determinujących żywotność przechowywanych nasion z rodzaju *Nicotiana* była temperatura. Porównano dwa przypadki, tj. obniżenie temperatury przechowywania z 20°C do 0°C oraz obniżenie z 0°C do -18°C. W pierwszym przypadku okres, w którym nasiona zachowały zdolność kiełkowania wynoszącą co najmniej 75%, uległ wydłużeniu z 10 lat do około 30, a w drugim z 30 lat do ponad 50.

Warto podkreślić, że w pracy Agackiej i in. (2015) po raz pierwszy przeprowadzono mapowanie QTL w tytoniu dla cech związanych z żywotnością nasion, a w następnej pracy Agackiej i in. (2021) dokonano identyfikacji QTL dla kolejnej populacji mapującej. Analiza pozwoliła na wykrycie regionów chromosomowych kontrolujących wybrane cztery cechy

charakteryzujące żywotność nasion. W ten sposób potwierdzono, iż żywotność nasion tytoniu, tak jak w przypadku innych roślin, ma charakter poligeniczny. W badaniach wykorzystano dwie populacje mapujące (Florida 301 $\times$ Hicks i Beinhart–1000 $\times$ Hicks) stworzone pierwotnie do poszukiwania regionów genetycznych kontrolujących odporność na zgniliznę pierścieniową podstawy łodygi. Podatna na chorobę odmiana Hicks charakteryzowała się wysoką wyjściową zdolnością kiełkowania. Jednak w teście kontrolowanego starzenia zdolność i szybkość kiełkowania nasion uległy obniżeniu w większym stopniu niż w przypadku odmian Florida 301 i Beinhart–1000 odpornych na tę chorobę. Rozkład cech fenotypowych wyraźnie wskazuje, iż odmiana Hicks przejawia niższą tolerancję w teście kontrolowanego starzenia, co skutkuje niższą żywotnością nasion w porównaniu z pozostałymi odmianami rodzicielskimi. A zatem wysoka wyjściowa zdolność kiełkowania nie oznacza, że nasiona zachowują żywotność przez długi okres. Wykazano to również u innych gatunków roślin jak jęczmień, pszenica, żyto, sorgo, rzepak czy len (Nagel i Börner, 2010). Nasiona o wysokiej wyjściowej zdolności kiełkowania przechowywane przez 26 do 33 lat w różnym stopniu traciły żywotność, która u niektórych obiektów obniżyła się nawet do zera.

Chociaż żywotność i długość życia nasion są kontrolowane poligenicznie, to w populacji mapującej Florida 301 $\times$ Hicks na czterech chromosomach zidentyfikowano tylko cztery regiony genomowe związane z czterema badanymi cechami w nasionach poddanych i niepoddanych postarzaniu. Główne QTL dla całkowitej zdolności kiełkowania zlokalizowano w grupie sprzężeń 8/18. Prawdopodobnie jest to region kontrolujący zdolność kiełkowania, który nie zależy od jakości nasion, ponieważ został wykryty zarówno w nasionach kontrolnych jak i postarzanych. Z kolei na chromosomie 23 zlokalizowano region, w którym w nasionach kontrolnych wykryto QTL odpowiedzialne za szybkość kiełkowania, a korzystne allele pochodziły od odmiany Hicks. W rejonie tym zidentyfikowano również QTL powiązane z wytwarzaniem siewek normalnych przez nasiona postarzane, a allele te pochodziły od odmiany Florida 301. Prawdopodobnie zidentyfikowany QTL dla szybkości kiełkowania staje się nieaktywny po zabiegu kontrolowanego starzenia, co potwierdzają również obserwacje fenotypowe.

Badania dotyczące poszukiwania QTL związanych z żywotnością nasion u pszenicy czy jęczmienia wykazały, że często są one zlokalizowane w regionach, w których wykrywano QTL związane z odpornością na stresy biotyczne i abiotyczne wpływające na jakość

produkowanych nasion (Nagel i in., 2009; Nagel i in., 2014; Rehman Arif i in., 2012). Populacja mapująca Florida 301 × Hicks została stworzona do identyfikacji QTL związanych z odpornością na zgniliznę pierścieniową podstawy łodygi powodowaną przez *Phytophthora nicotianae*. Objawy choroby to więdnienie i żółknięcie liści prowadzące do osłabienia ogólnej kondycji rośliny. W efekcie zmiany chorobowe mogą mieć wpływ na rozwój nasion. QTL odpowiedzialny za szybkie kiełkowanie nasion tytoniu zlokalizowany na chromosomie 6 jest porównywalny z QTL związanym z odpornością na *Ph. nicotianae* i został wykryty zarówno w badaniach szklarniowych jak i polowych. Korzystny allel został wniesiony przez odmianę Florida 301 odporną na tego patogena (Xiao i in., 2013).

Stosunkowo więcej QTL związanych z żywotnością nasion, w porównaniu do pierwszej populacji mapującej, wykryto w populacji mapującej Beinhart–1000 × Hicks. Zidentyfikowano 23 rejony QTL o działaniu addytywnym, rozmieszczone na 11 chromosomach i kontrolujące zmienność 4 badanych cech związanych z żywotnością nasion tytoniu. Spośród 23 rejonów QTL osiem posiadało wartości LOD większe niż 3, przez co zostały uznane za wysoce istotne, a 15 (z wartościami LOD poniżej 3) za istotne. Dla cechy całkowita zdolność kiełkowania wykryto 3 rejony QTL w obiektach kontrolnych i dwa w nasionach postarzanych. Największą liczbę QTL zidentyfikowano w nasionach kontrolnych dla szybkości kiełkowania, po 6 *loci* dla cech T50 i AUC. Natomiast w nasionach postarzanych liczba wykrytych QTL była niższa o połowę. Każdy ze zidentyfikowanych QTL odpowiadał za 3,3–18,8% zmienności fenotypowej.

QTL o działaniu epistatycznym wykryto tylko dla liczby skielkowanych nasion. Dla nasion kontrolnych zidentyfikowano cztery pary QTL zlokalizowane na chromosomach 3, 5, 8 i 24, zaś dla nasion sztucznie postarzanych jedną parę na chromosomach 22 i 24. W obu populacjach obydwój rodzice byli donorami alleli pozytywnie kształtujących badane cechy.

Pomimo tego, że populacje mapujące posiadały wspólnego rodzica, nie znaleziono QTL wspólnych dla obydwu populacji. Nasiona populacji mapujących regenerowano w innych latach i w różnych lokalizacjach, co może mieć duży wpływ na wykrywanie QTL. Warunki uprawy rośliny matecznej mają bowiem istotny wpływ na żywotność nasion, co pokazują badania na innych gatunkach roślin. Nagel i in. (2014) szukali genetycznych podstaw żywotności nasion w populacji mapującej jęczmienia regenerowanej w tym samym sezonie wegetacyjnym na

dwóch różnych polach doświadczalnych położonych blisko siebie. Badacze wykryli *loci* wspólne dla populacji, ale także wiele innych specyficznych *loci* charakterystycznych dla warunków prowadzonych doświadczeń. Podobnie w przypadku rzepaku, Schatzki i in. (2013) zaobserwowali wysoce istotny wpływ lokalizacji plantacji nasiennej na żywotność uzyskanych nasion. Wskazali tym samym, że czynniki środowiskowe, takie jak nawożenie i warunki wzrostu rośliny, w dużym stopniu oddziałują na żywotność zbieranych i przechowywanych nasion.

Podsumowując niniejsze opracowanie można stwierdzić, że uzyskane wyniki potwierdzają złożoność i poligeniczny charakter żywotności nasion tytoniu. Badania genetyczne różnych populacji przechowywanych w różnych warunkach są niezbędne dla zrozumienia genetycznych mechanizmów kontrolujących żywotność nasion.

Przedstawione wyniki mogą być przyczynkiem do kolejnych badań nad czynnikami genetycznymi kształtującymi żywotność nasion tytoniu, z wykorzystaniem populacji biparentalnych jak i mapowania asocjacyjnego i identyfikacji genów kandydujących. W przyszłości zasadne wydaje się włączenie badań metabolomicznych, które będą uzupełnieniem wiedzy na temat zależności genotyp – fenotyp.

8. Podsumowanie i wnioski

1. Nasiona *Nicotiana tabacum* i *Nicotiana rustica* charakteryzowały się zróżnicowaną żywotnością w zależności od warunków przechowywania. Istotnym czynnikiem wpływającym na utrzymanie żywotności nasion była temperatura przechowywania. Jej obniżenie z 20°C do 0°C wydłużyło okres przechowywania nasion średnio z 10 do 30 lat, a obniżenie temperatury z 0°C do -18°C wydłużyło okres przechowywania o kolejne 20 lat, przyjmując zdolność kiełkowania nasion powyżej 75% jako wartość progową.
2. Zdolność kiełkowania nasion *N. tabacum* i *N. rustica* przechowywanych w takich samych warunkach ulegała obniżeniu na podobnym poziomie, co może wynikać z bliskiego pokrewieństwa tych gatunków i tym samym zbliżonego profilu genetycznego.
3. Po raz pierwszy dla *N. tabacum* zidentyfikowano QTL dla cech związanych z żywotnością nasion: liczba skielkowanych nasion (%TG–C, %TG–CD), zdolność kiełkowania (%NG–C, %NG–CD), czas potrzebny do skielkowania 50% nasion w próbie (T50–C, T50–CD) oraz pole powierzchni pod krzywą czasu kiełkowania wyznaczone po 200 godzinach kiełkowania (AUC–C, AUC–CD).
4. W populacji mapującej Florida 301 × Hicks zidentyfikowano 4 regiony genetyczne zlokalizowano na 4 chromosomach kontrolujące cztery cechy związane z żywotnością nasion tytoniu.
5. QTL dla cechy liczba skielkowanych nasion, zlokalizowany na chromosomie 8/18 prawdopodobnie jest regionem odpowiedzialnym za tę cechę niezależnie od jakości nasion, gdyż został zmapowany w nasionach kontrolnych jak i w nasionach poddanych sztucznemu postarzaniu.
6. QTL związany z szybkością kiełkowania nasion jest porównywalny z *locus*, w którym zidentyfikowano QTL dla odporności tytoniu na zgniliznę pierścieniową podstawy łodygi. Korzystny allel został wniesiony przez odmianę Florida 301, odporną na tę

chorobę, co może świadczyć, że odporność na stresy biotyczne jest związana z uzyskaniem lepszej jakości nasion, dłużej zachowujących żywotność.

7. W populacji mapującej Beinhart–1000 × Hicks wykryto 23 regiony QTL o działaniu addytywnym, rozmieszczone na 11 chromosomach, kontrolujące zmienność 4 badanych cech związanych z żywotnością nasion tytoniu. Dla cechy liczba skielkowanych nasion zidentyfikowano QTL o działaniu epistatycznym. Dla nasion kontrolnych wykryto cztery pary zlokalizowane na chromosomach 3, 5, 8 i 24 zaś dla nasion sztucznie postarzanych jedną parę zlokalizowaną na chromosomach 22 i 24.

9. Literatura

1. Abewoy Fentik D. (2017). Review on Genetics and Breeding of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Advances in Crop Science and Technology*, 05(05), 306.
2. Ali M. R., Rahman M. M., Asaduzzaman M., Khan M. A. H., Rahman J. (2019). Moisture level and storage container effects on seed quality of soybean genotypes under ambient condition.
3. Arif M. A. R., Afzal I., Börner A. (2022). Genetic aspects and molecular causes of seed longevity in plants—A review. *Plants*, 11(5), 598.
4. Arif M. A. R., Agacka-Mołodoch M., Qualset C. O., Börner A. (2022). Mapping of additive and epistatic QTLs linked to seed longevity in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Cereal Research Communications*, 1–7.
5. Arif M.A.R., Nagel M., Neumann K., Kobiljski B., Lohwasser U., Börner A. (2012) Genetic studies of seed longevity in hexaploid wheat using segregation and association mapping approaches. *Euphytica*, 186, 1–13.
6. Arif M.A.R., Shokat S., Plieske J., Ganai M., Lohwasser U., Chesnokov Y.V., Kocherina N.V.; Kulwal P., Kumar N., McGuire P.E (2021). A SNP-based genetic dissection of versatile traits in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *The Plant Journal*, 108(4), 960–976.
7. Barzali M., Lohwasser U., Niedzielski M., Börner A. (2005). Effects of different temperatures and atmospheres on seed and seedling traits in a long-term storage experiment on rye (*Secale cereale* L.). *Seed Science and Technology*, 33(3), 713–721.
8. Bentsink L., Alonso-Blanco C., Vreugdenhil D., Tesnier K., Groot S.P.C., Koornneef M. (2000). Genetic analysis of seed-soluble oligosaccharides in relation to seed storability of Arabidopsis. *Plant physiology*, 124(4), 1595–1604.
9. Berbé A., Trojak-Goluch A. (2001). Response to black root rot (*Thielaviopsis tabacina* Ferr.) of several flu-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) genotypes in different testing environments. *Plant Breeding and Seed Science*, 45(2), 11–20.
10. Berbé A. (2006). Field performance of Poland's new flue-cured tobacco varieties resistant to *Chalara elegans*. In CORESTA Congress, 15–20 October, Paris, AP22.
11. Berbé A. (2007). Mieszańce Virginii odporne na czarną zgniliznę korzeni wyhodowane w IUNG-PIB oferowane do uprawy w roku 2008. *Przemysł Tytoniowy*, 4, 14–16.

12. Berbeć A., Laskowska D. (2005). Investigations of isogenomic alloplasmics of flue-cured tobacco *Nicotiana tabacum* cv. Wiślica. Contributions to Tobacco & Nicotine Research, 21,5.
13. Berbeć A., Doroszevska T. (1992). Alloplasmic forms of cultivated tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) with substituted cytoplasm from the species *N. amplexicaulis*, *N. knightiana* and *N. raimondii*. Pamiętniki Puławskie, 100, 142–150.
14. Berbeć A., Doroszevska T. (2020). The Use of *Nicotiana* species in tobacco Improvement. The Tobacco Plant Genome, 101–146.
15. Bewley J. D., Black M. (2014). Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination: 1 development, germination, and growth. Springer.
16. Bindler G., Plieske J., Bakaher N., Gunduz I., Ivanov N., Van der Hoeven R., Ganai M., Donini P. (2011). A high density genetic map of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from large scale microsatellite marker development. Theoretical and Applied Genetics, 123, 219–230.
17. Bindler G., Vand H.R., Gunduz I., Plieske J., Ganai M., Rossi L., Gadani F., Donini P. (2007). A microsatellite marker based linkage map of tobacco. Theoretical and Applied Genetics, 114, 341–349.
18. Boczkowska M., Rucinska A., Targonska-Karase, M., Olszak M., Niedzielski M., Rakoczy-Trojanowska M. (2018). Starzenie się nasion – złożony problem banków genów. Praca przeglądowa. Agronomy Science, 73(4).
19. Börner A., Landjeva S., Nagel M., Rehman Arif M. A., Allam M., Agacka, M., Doroszevska T., Lohwasser U. (2014). Plant Genetic Resources for Food and Agriculture (PGRFA)–Maintenance and Research. Genetics and Plant Physiology, 4(1/2), 13–21.
20. Buitink J., Leprince O. (2008). Intracellular glasses and seed survival in the dry state. Comptes Rendus Biologies, 331(10), 788–795.
21. Cho J. N., Ryu J. Y., Jeong Y. M., Park J., Song J. J., Amasino R. M., Noh B., Noh Y. S. (2012). Control of seed germination by light-induced histone arginine demethylation activity. Developmental cell, 22(4), 736–748.
22. Chojnowski M. G., Dostatny D. F., Bakalarska A., Kapusta E., Szyszkowska K. (2022). Kolekcja aktywna nasion zasobów genowych roślin ogrodniczych w Regionalnym Centrum Bioróżnorodności Ogrodniczej Instytutu Ogrodnictwa-Państwowego Instytutu

- Badawczego w Skierniewicach. Zeszyty Naukowe Instytutu Ogrodnictwa, (30), 1–14.
23. Clerkx E.J.M., El-Lithy M.E, Vierling E., Ruys G.J., Blankestijn-DeVries H., Groot S.P.C., Vreugdenhil D., Koornneef M. (2004). Analysis of natural allelic variation of *Arabidopsis* seed germination and seed longevity traits between the accessions Landsberg erecta and Shakdara, using a new recombinant inbred line population. *Plant Physiology*, 135(1), 432–443.
24. Collard B. C., Jahufer M. Z. Z., Brouwer, J. B., Pang, E. C. K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*, 142, 169–196.
25. Copeland L. O., McDonald M. F. (2012). *Principles of seed science and technology*. Springer Science & Business Media.
26. Czembor J. H., Gryziak G., Zaczynski M., Puchta M., Czembor E. (2017). Gromadzenie i zachowanie zasobów genowych roślin użytkowych w Polsce – artykuł przeglądowy Część 2. Przechowywanie zasobów genowych w formie nasion, prowadzenie herbarium, baz danych i udostępnianie zasobów genowych. *Agronomy Science*, 72(4).
27. Czembor J. H., Gryziak G., Zaczynski M., Puchta M., Czembor E., Czembor J. H. (2017). Gromadzenie i zachowanie zasobów genowych roślin użytkowych w Polsce – artykuł przeglądowy Część 1. Gromadzenie zasobów genowych roślin użytkowych w trakcie ekspedycji krajowych i zagranicznych. *Agronomy Science*, 72(4), 135–146.
28. Czubacka A. (2022). The Use of the Polish Germplasm Collection of *Nicotiana tabacum* in Research and Tobacco Breeding for Disease Resistance. *Agriculture*, 12(12), 1994.
29. Czubacka A., Depta A., Doroszevska T. (2020). Zróżnicowanie reakcji odpornościowej na wirus Y ziemniaka wśród alloplazmatycznych form tytoniu. *Polish Journal of Agronomy*, (39), 27–34.
30. Dehaye L., Duval M., Viguier D., Yaxley J., Job D. (1997). Cloning and expression of the pea gene encoding SBP65, a seed-specific biotinylated protein. *Plant Molecular Biology*, 35, 605–621.
31. Deng Y., Ning Y., Yang D. L., Zhai K., Wang G. L., He Z. (2020). Molecular basis of disease resistance and perspectives on breeding strategies for resistance improvement in crops. *Molecular Plant*, 13(10), 1402–1419.
32. Depta A., Doroszevska T. (2023). Diversity of *Nicotiana* species. *Polish Journal of*

- Agronomy, 52(1), 123–135.
33. Depta A., Doroszeńska T., Czubańska A. (2020). Zróżnicowanie reakcji odpornościowej wybranych odmian tytoniu (*Nicotiana tabacum*) w zależności od użytego izolatu wirusa Y ziemniaka (PVY). Polish Journal of Agronomy, (42), 3–13.
 34. Depta A., Doroszeńska T., Czubańska A. (2021). Resistance response of the recently discovered species *Nicotiana mutabilis* to *Potato virus Y* (PVY) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) compared to other sources of resistance. Agronomy, 11(8): 1617.
 35. Depta A., Kursa K., Doroszeńska T., Laskowska D., Trojak-Goluch A. (2018). Reaction of *Nicotiana* species and cultivars of tobacco to *Tobacco Mosaic Virus* and detection of the N gene that confers hypersensitive resistance. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 54 (3): 143–146.
 36. Desheva, G. (2016). The longevity of crop seeds stored under long-term condition in the national gene bank of Bulgaria. Agriculture (Pol'nohospodárstvo), 62(3), 90–100.
 37. Dobiesz M., Piotrowicz-Cieślak A. I., Michalczyk D. J. (2017). Physiological and biochemical parameters of lupin seed subjected to 29 years of storage. Crop Science, 57(4), 2149–2159.
 38. Dong X.Y., Fan S.X., Jin L.I., Qi W.A., Li M.R., Jiang X., Liu Z.Y., Yin Y.C., Wang J.Y. (2017). Identification of QTLs for seed storability in rice under natural aging conditions using two RILs with the same parent Shennong 265. Journal of Integrative Agriculture, 16(5), 1084–1092.
 39. Doroszeńska T. (2010). Transfer of tolerance to different *Potato virus Y* (PVY) isolates from *Nicotiana africana* Merxm. to *Nicotiana tabacum* L. Plant Breeding, 129(1), 76–81.
 40. Doroszeńska T., Czubańska A. (2008). Ocena odporności odmian i linii hodowlanych tytoniu na wirusa Y ziemniaka (PVY). Studia i Raporty IUNG-PIB, 13: 29–42.
 41. Doroszeńska T., Depta A. (2011). Resistance of wild *Nicotiana* species to different PVY isolates. Phytopathologia, 59, 9–24.
 42. Doroszeńska T., Depta A., Czubańska A. (2009). Album gatunków z rodzaju *Nicotiana* / Album of *Nicotiana* species. Puławy: Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy.
 43. Doroszeńska T., Przybys M. (2007). Charakterystyka odporności gatunków *Nicotiana* na czarna zgniliznę korzeni *Thielaviopsis basicola* [BERK. and BROOME] FERR.

- Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 1(517), 253–266.
44. Doroszevska T., Depta A. (2011). Resistance of wild *Nicotiana* species to different PVY isolates. *Phytopathologia* 2011, 59, 9–24.
 45. Drake-Stowe K., Bakaher N., Goepfert S., Philippon B., Mark R., Peterson, P., Lewis R. S. (2017). Multiple disease resistance loci affect soilborne disease resistance in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Phytopathology*, 107(9), 1055–1061.
 46. Ellis R. H., Hong T. D. (2006). Temperature sensitivity of the low-moisture-content limit to negative seed longevity–moisture content relationships in hermetic storage. *Annals of botany*, 97(5), 785–791.
 47. Ellis R. H., Hong T. D., Roberts E. H. (1988). A low-moisture-content limit to logarithmic relations between seed moisture content and longevity. *Annals of Botany*, 61(4), 405–408.
 48. Ellis R. H., Hong T. D., Roberts E. H. (1991). Seed moisture content, storage, viability and vigour. *Seed Science Research*, 1(4), 275–279.
 49. Ellis R. H., Hong T. D., Roberts, E. H. (1989). A comparison of the low-moisture-content limit to the logarithmic relation between seed moisture and longevity in twelve species. *Annals of Botany*, 63(6), 601–611.
 50. Ellis R. H., Roberts E. H. (1980). Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany*, 45(1), 13–30.
 51. Ellis R.H., Hong T.D. (2007). Seed longevity – moisture content relationships in hermetic and open storage. *Seed Science and Technology*, 35, 423–431.
 52. FAO (2007). The value of plant genetic resources. Fact Sheet No. 2.
 53. FAO (2010). The second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
 54. FAO (2013). Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
 55. FAO (2014). Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rev. ed. Rome.
 56. Fu Y. B., Ahmed Z., Diederichsen A. (2015). Towards a better monitoring of seed ageing under ex situ seed conservation. *Conservation Physiology*, 3(1), cov026.
 57. Geffersa A. G., Burdon J. J., Macfadyen S., Thrall P. H., Sprague S. J., Barrett L. G.

- (2023). The socio-economic challenges of managing pathogen evolution in agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 378(1873), 20220012.
58. Groot S. P. C., Surki A. A., De Vos R. C. H., Kodde J. (2012). Seed storage at elevated partial pressure of oxygen, a fast method for analysing seed ageing under dry conditions. *Annals of Botany*, 110(6), 1149–1159.
 59. Gryziak G. (2020). Znaczenie roślinnych zasobów genowych. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, (290), 9–10.
 60. Gryziak G., Zaczynski M., Klimont K. (2016). Roślinne zasoby genetyczne i ich wykorzystanie w hodowli i badaniach naukowych. *Rolnictwo XXI wieku–problemy i wyzwania*, 75.
 61. Guo X., Sun X., Liu S., Gong C., Feng C., Han X., Lv T., Zhou Y., Wang Z., Di H. (2021). Screening and application of SSR markers related to seed storability traits in maize (*Zea mays* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 68, 2521–2535.
 62. Han Q., Chen K., Yan D., Hao G., Qi J., Wang C., Dirk L.M., Bruce Downie A.; Gong, J., Wang J. (2020). ZmDREB2A regulates ZmGH3. 2 and ZmRAFS, shifting metabolism towards seed aging tolerance over seedling growth. *The Plant Journal*, 104(1), 268–282.
 63. Han Z., Ku L., Zhang Z., Zhang J., Guo S., Liu H., Zhao R., Ren Z., Zhang L., Su H., Dong L., Chen Y. (2014). QTLs for seed vigor-related traits identified in maize seeds germinated under artificial aging conditions. *PloS One*, 9(3), e92535.
 64. Harrington J.F. (1963). Practical instructions and advice on seed storage. *Proceedings of the International Seed Testing Association*, 28, 989–994.
 65. Hartmann Filho C. P., Goneli A. L. D., Masetto T. E., Martins E. A. S., Oba G. C. (2016). The effect of drying temperatures and storage of seeds on the growth of soybean seedlings. *Journal of Seed Science*, 38(04), 287–295.
 66. Hay F.R., Adams J., Manger K., Probert R. (2008). The use of nonsaturated lithium chloride solutions for experimental control of seed water content. *Seed Science and Technology*, 36(3), 737–746.
 67. Hay F.R., de Guzman F., Ellis D., Makahiya H., Borromeo T., Hamilton N.R.S. (2013). Viability of *Oryza sativa* L. seeds stored under genebank conditions for up to 30 years. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60, 275–296.
 68. Hong T. D., Ellis R. H., Astley D., Pinnegar A. E., Groot S. P. C., Kraak H. L. (2005).

- Survival and vigour of ultra-dry seeds after ten years of hermetic storage. *Seed Science and Technology*, 33(2), 449–460.
69. Hosamani J., Kumar M.A., Talukdar A. Lal S., Dadlani M. (2013). Molecular characterization and identification of candidate markers for seed longevity in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 73(01), 64–71.
 70. Hundertmark M., Buitink, J. Leprince O., Hinch D. K. (2011). The reduction of seed-specific dehydrins reduces seed longevity in *Arabidopsis thaliana*. *Seed Science Research*, 21(3), 165–173.
 71. ISTA (2012). International Rules for Seed Testing, International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.
 72. ISTA (2015). International rules for seed testing. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.
 73. Joosen R. V., Kodde J., Willem, L. A., Ligterink W., Van Der Plas L. H., Hilhorst H. W. (2010). GERMINATOR: a software package for high-throughput scoring and curve fitting of *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Journal*, 62(1), 148–159.
 74. Julio E., Denoyes-Rothan B., Verrier J.L., de Borne F. (2006). Detection of QTLs linked to leaf and smoke properties in *Nicotiana tabacum* based on a study of 114 recombinant inbred lines. *Molecular Breeding*, 18(1), 69–91.
 75. Kenton A., Parokonny A. S., Gleba Y. Y., Bennett M. D. (1993). Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics MGG*, 240, 159–169.
 76. Kincaid R.R. (1943). Effect of storage conditions on the viability of tobacco seed. *Journal of Agricultural Research*, 67, 407–410.
 77. Korbecka-Glinka G., Czubańska A., Przybys M., Doroszevska T.(2017). Resistance vs. tolerance to Potato virus Y in tobacco—comparing effectiveness using virus isolates from Central Europe. *Breeding Science*, 67(5), 459–465.
 78. Korbecka-Glinka G., Trojak-Goluch A., Doroszevska T., Goepfert S. (2019). 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*, (285).
 79. Landjeva S., Lohwasser U., Börner A. (2010). Genetic mapping within the wheat D

- genome reveals QTL for germination, seed vigour and longevity, and early seedling growth. *Euphytica* 171:129–143.
80. Laskowska D. (2007). Różnorodność biologiczna w kolekcji *Nicotiana tabacum* L. zgromadzonej w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa - PIB w Puławach, Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych z.517:73–81.
 81. Laskowska D., Berbeć A. (2006). Resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in *Nicotiana alata* and *N. sanderae* and in hybrids between *N. tabacum* and *N. alata*. *Plant Breeding and Seed Science*, 54, 91–100.
 82. Laskowska D., Berbeć A. (2007). Nowa męskosterylina linia *Nicotiana tabacum* L. z cytoplazmą *N. wuttkei* Clarkson et Symon. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, (244), 289–296.
 83. Laskowska D., Doroszevska T., Depta A., Kurska K., Olszak-Przybyś H., Czubacka A. (2013). A survey of *Nicotiana* germplasm for resistance to Tomato spotted wilt virus (TSWV). *Euphytica*, 193, 207–219.
 84. Lewis R. S. (2011). *Nicotiana*. In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Plantation and Ornamental Crops* by Ch. Kole (pp. 185–208). Springer Verlag Berlin Heidelberg.
 85. Lewis R. S. (2020). *Nicotiana tabacum* L.: Tobacco. *Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants*, 345–375.
 86. Lewis R.S., 2021. Long-term public maintenance of *Nicotiana* germplasm. *Nicotiana Germplasm Collection Task Force. Final Report. CORESTA*, November.
 87. Lewis R., Milla S.R., Kernodle S.P. (2007). Analysis of an introgressed *Nicotiana tomentosa* genomic region affecting leaf number and correlated traits in *Nicotiana tabacum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 114, 841–854
 88. Li L., Lin Q., Liu S., Liu X. I., Wang W., Hang N. T., Liu, F., Zhao, Z., Jiang, L., Wan J. (2012). Identification of quantitative trait loci for seed storability in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Breeding*, 131(6), 739–743.
 89. Marcos Filho J. (2015). Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. *Scientia Agricola*, 72(4), 363–374.
 90. Meng L., Li H., Zhang L., Wang J. (2015). QTL IciMapping: integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental

- populations. *The Crop Journal*, 3(3), 269–283.
91. Michałowska D., Białoskórska D. (2022). Banki genów jako forma zwiększania różnorodności biologicznej w rolnictwie. *Ziemniak Polski*, 32(4).
 92. Miura K., Lyn SY., Yano M., Nagamine T. (2002). Mapping quantitative trait loci controlling seed longevity in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 981–986.
 93. Moon H. S., Nicholson J. S., Lewis R. S. (2008). Use of transferable *Nicotiana tabacum* L. microsatellite markers for investigating genetic diversity in the genus *Nicotiana*. *Genome*, 51(8), 547–559.
 94. Nadarajan J., Walters C., Pritchard H.W., Ballesteros D., Colville L. (2023). Seed longevity—the evolution of knowledge and a conceptual framework. *Plants*, 12(3), 471.
 95. Nagel M., Börner A. (2010). The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. *Seed Science Research*, 20(1), 1–12.
 96. Nagel M., Kranner I., Neumann K., Rolletschek H., Seal C., Colville L., Fernandez-Marin B., Börner A. (2014). Genome-wide association mapping and biochemical markers reveal that seed ageing and longevity are intricately affected by genetic background, developmental and environmental conditions in barley. *Plant, Cell & Environment*, 38(6), 1011–1022.
 97. Nagel M., Rehman-Arif M.A., Rosenhauer M., Börner A. (2010). Longevity of seeds—intraspecific differences in the Gatersleben genebank collections. In: *Proc 60th Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs*, Gumpenstein, Österreich, 24–26 Nov 2009, p 179–181.
 98. Nagel M., Rosenhauer M., Willner E., Snowdon R.J., Friedt W., Börner A. (2011). Seed longevity in oilseed rape (*Brassica napus* L.)—genetic variation and QTL mapping. *Plant Genetic Resources*, 9(2), 260–263.
 99. Nagel M., Vogel H., Landjeva S., Buck-Sorlin G., Lohwasser U., Scholz U., Börner A. (2009). Seed conservation in ex situ genebanks—genetic studies on longevity in barley. *Euphytica* 170, 5–14 .
 100. Nguyen T. P., Keizer P., van Eeuwijk F., Smeekens S., Bentsink L. (2012). Natural variation for seed longevity and seed dormancy are negatively correlated in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 160(4), 2083–2092.

101. Nishi T., Tajima T., Noguchi S., Ajisaka H., Nedishi H. (2003). Identification of DNA markers of tobacco linked to bacterial wilt resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 765–770.
102. Pathirana R., Carimi F. (2022). Management and utilization of plant genetic resources for a sustainable agriculture. *Plants*, 11(15), 2038.
103. Pirredda, M., Fañanás-Pueyo, I., Oñate-Sánchez, L., & Mira, S. (2023). Seed Longevity and Ageing: A Review on Physiological and Genetic Factors with an Emphasis on Hormonal Regulation. *Plants*, 13(1), 41.
104. Podyma W. (2000). Rola banku genów we wdrażaniu globalnych i krajowych planów ochrony różnorodności biologicznej. *Biuletyn Ogrodów Botanicznych, Muzeów i Zbiorów*, 9, 99–106.
105. Powell A. A., Matthews S. (2005). Towards the validation of the controlled deterioration vigour test for small seeded vegetables. *Seed Testing International*, 129, 21–24.
106. Priestley D.A., Cullinan V.I., Wolfe J. (1985). Differences in seed longevity at the species level. *Plant, Cell and Environment*, 8, 557–562.
107. Probert R., Adams J., Coneybeer J., Crawford A., Hay F. (2007). Seed quality for conservation is critically affected by pre-storage factors. *Australian Journal of Botany*, 55(3), 326–335.
108. Puchta M. (2020). miRNA zaangażowane w proces starzenia i kiełkowania nasion. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, (290), 21–26.
109. Puchta M., Groszyk J., Małecka M., Koter M. D., Niedzielski M., Rakoczy-Trojanowska M., Boczkowska M. (2021). Barley seeds miRNome stability during long-term storage and aging. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4315.
110. Rao N. K., Dulloo M. E., Engels J. M.M. (2017). A review of factors that influence the production of quality seed for long-term conservation in genebanks. *Genetic resources and crop evolution*, 64, 1061–1074.
111. Rao P. J. M., Pallavi M., Bharathi Y., Priya P. B., Sujatha P., Prabhavathi K. (2023). Insights into mechanisms of seed longevity in soybean: a review. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1206318.
112. Rehman Arif M.A., Nagel M., Neumann K., Kobiljski B., Lohwasser U., Börner A.

- (2012). Genetic studies of seed longevity in hexaploid wheat using segregation and association mapping approaches. *Euphytica* 186:1–13.
113. Revilla P., Butrón A., Rodríguez V. M., Malvar R. A., Ordás A. (2009). Identification of genes related to germination in aged maize seed by screening natural variability. *Journal of Experimental Botany*, 60(14), 4151–4157.
 114. Revilla P., Velasco P., Malvar R. A., Cartea M. E., Ordás A. (2006). Variability among maize (*Zea mays* L.) inbred lines for seed longevity. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, 771–777.
 115. Roberts E. H. (1972). Storage environment and the control of viability. In *Viability of seeds* (pp. 14–58). Dordrecht: Springer Netherlands.
 116. Salgotra R. K., Chauhan B. S. (2023). Genetic diversity, conservation, and utilization of plant genetic resources. *Genes*, 14(1), 174.
 117. Sano N., Ono H., Murata K., Yamada T., Hirasawa T., Kanekatsu, M. (2015). Accumulation of long-lived mRNAs associated with germination in embryos during seed development of rice. *Journal of Experimental Botany*, 66(13), 4035–4046.
 118. Sano N., Rajjou L., North H. M., Debeaujon I., Marion-Poll A., Seo M. (2016). Staying alive: molecular aspects of seed longevity. *Plant and Cell Physiology*, 57(4), 660–674.
 119. Sasaki K., Fukuta Y., Sato T. (2005). Mapping of quantitative trait loci controlling seed longevity of rice (*Oryza sativa* L.) after various periods of seed storage. *Plant Breeding*, 124(4), 361–366.
 120. Schatzki J., Schoo B., Ecke W., Herrfurth, C., Feussner I., Becker H. C., Möllers C. (2013). Mapping of QTL for seed dormancy in a winter oilseed rape doubled haploid population. *Theoretical and Applied Genetics*, 126, 2405–2415.
 121. Schwember A. R., Bradford K. J. (2010). Quantitative trait loci associated with longevity of lettuce seeds under conventional and controlled deterioration storage conditions. *Journal of Experimental Botany*, 61(15), 4423–4436.
 122. Singh M., Singh S., Randhawa H., Singh J. (2013). Polymorphic homoeolog of key gene of RdDM pathway, ARGONAUTE4_9 class is associated with pre-harvest sprouting in wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS One*, 8(10), e77009.
 123. Singh N., Dash., Khan Y. J. (2016). Survival of chickpea, sesame, niger, castor and safflower seeds stored at low and ultra low moisture contents for 16-18 years.

- Seed Science and Technology, 44(3), 542–555.
124. Singh R. K., Raipuria R. K., Bhatia V. S., Rani A., Husain S. M., Chauhan D., Chauhan GS., Mohapatra T. (2008). SSR markers associated with seed longevity in soybean. *Seed Science and Technology*, 36(1), 162–167.
 125. Solberg S. Ø., Yndgaard F., Andreassen C., Von Bothmer R., Loskutov I. G., Asdal Å. (2020). Long-term storage and longevity of orthodox seeds: A systematic review. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1007.
 126. Sosnowska D., Sobiczewski P., Zbytek Z., Czembor, J. H. (2016). Integrowana produkcja roślin-korzyści i perspektywy. *Progress in Plant Protection*, 56(1).
 127. Specht C. E., Börner A. (1998). An interim report on a long term storage experiment on rye (*Secale cereale* L.) under a range of temperatures and atmospheres. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45, 483–488.
 128. Steiner A., Ruckenbauer P. (1995). Germination of 110-year-old cereal and weed seeds, the Vienna Sample of 1877. Verification of effective ultra-dry storage at ambient temperature. *Seed Science Research*, 5(4), 195–199.
 129. Szy-p-Borowska I. (2005). Mapowanie cech ilościowych jako nowe narzędzie w hodowli selekcyjnej drzew leśnych. *Leśne Prace Badawcze*, (1), 99–107.
 130. Tong Z., Zhou J., Xiu Z., Jiao F., Hu Y., Zheng F., Chen X., Li Y., Fang D., Li S., Wu X., Zeng J., Zhao S., Jian J., Xiao B. (2020). Construction of a high-density genetic map with whole genome sequencing in *Nicotiana tabacum* L. *Genomics*, 112(2), 2028–2033.
 131. Tong Z., Zhang Q., Lin F., Chen X., Xu, H. (2023). Construction of a high-density genetic map and dissection of genetic architecture of six agronomic traits in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 14, 1126529.
 132. Toole E.H., Brown E. (1946). Final results of the Duvel buried seed experiment. *Journal of Agricultural Research* 72, 201–210.
 133. TRI, (2016), Tobacco Research Institute of the Chinese. Academy of Agricultural Sciences. Bulletin.
 134. Trojak-Goluch A. (2014). Wigola – doskonalsza wersja Wiślicy. *Przegląd Tytoniowy*, 130, 92–95.
 135. Vontimitta V., Danehower D. A., Steede T., Moon H. S., Lewis, R. S. (2010). Analysis of a *Nicotiana tabacum* L. Genomic Region Controlling Two Leaf Surface Chemistry

- Traits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(1), 294–300.
136. Vontimitta V., Lewis R.S. (2012). Mapping of quantitative trait loci affecting resistance to *Phytophthora nicotianae* in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) line Beinhart–1000. *Molecular Breeding*, 29, 89–98.
 137. Vontimitta V., Lewis R.S. (2012a). Growth chamber evaluation of a tobacco ‘Beinhart 1000’ × ‘Hicks’ mapping population for quantitative trait loci affecting resistance to multiple races of *Phytophthora nicotianae*. *Crop Science*, 52(1), 91–98.
 138. Walters C. (2015). Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. *Planta*, 242, 397–406.
 139. Walters C., Ballesteros D., Vertucci V. A. (2010). Structural mechanics of seed deterioration: standing the test of time. *Plant Science*, 179(6), 565–573.
 140. Walters C., Berjak P., Pammenter N., Kennedy K., Raven P. (2013). Preservation of recalcitrant seeds. *Science*, 339(6122), 915–916.
 141. Walters C., Hill L. M., Wheeler L. J. (2005). Dying while dry: kinetics and mechanisms of deterioration in desiccated organisms, *Integrative and Comparative Biology*, 45, 751–758.
 142. Walters C., Pence V. C. (2021). The unique role of seed banking and cryobiotechnologies in plant conservation. *Plants, People, Planet*, 3(1), 83–91.
 143. Walters C., Wheeler L., Grotenhuis J. (2005). Longevity of seeds stored in a genebank: Species characteristics. *Seed Science Research*, 15(1), 1–20.
 144. Wang R., Wu F., Xie X., Yang C. (2021). Quantitative trait locus mapping of seed vigor in soybean under -20°C storage and accelerated aging conditions via RAD sequencing. *Current Issues in Molecular Biology*, 43(3), 1977–1996.
 145. Wozny D., Kramer K., Finkemeier I., Acosta I. F., Koornneef M. (2018). Genes for seed longevity in barley identified by genomic analysis on near isogenic lines. *Plant, Cell & Environment*, 41(8), 1895–1911.
 146. Wu F., Luo X., Wang L., Wei Y., Li J., Xie H., Zhang J., Xie G. (2021). Genome-wide association study reveals the QTLs for seed storability in world rice core collections. *Plants*, 10(4), 812.
 147. Xia Y., Xu Y., Li J., Zhang C., Fan S. (2019). Recent advances in emerging techniques for non-destructive detection of seed viability: A review. *Artificial Intelligence*

- in Agriculture, 1, 35–47.
148. Xiao B., Drake K., Vontimitta V., Tong Z., Zhang, X., Li, M. Leng X., Li Y. Lewis, R. S. (2013). Location of genomic regions contributing to *Phytophthora nicotianae* resistance in tobacco cultivar Florida 301. Crop Science, 53(2), 473–481.
 149. Xue Y., Zhang S., Yao Q., Peng R., Xiong A., Li X., Zhu W., Zhu Y., Zha D. (2008). Identification of quantitative trait loci for seed storability in rice (*Oryza sativa* L.). Euphytica, 164, 739–744.
 150. Zeng D., Guo L., Xu Y., Yasukumi K., Zhu L., Qian Q. (2006). QTL analysis of seed storability in rice. Plant Breed, 125(1), 57–60.
 151. Zeng Z.B. (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics 136:1457–1468.
 152. Zhang K., Zhang Y., Sun J., Meng J., Tao J. (2021). Deterioration of orthodox seeds during ageing: Influencing factors, physiological alterations and the role of reactive oxygen species. Plant Physiology and Biochemistry, 158, 475–485.
 153. Zhang X., Hina A., Song S., Kong J., Bhat J.A., Zhao T. (2019). Whole-genome mapping identified novel “QTL hotspots regions” for seed storability in soybean (*Glycine max* L.). BMC genomics, 20, 1–14.

12. Wykaz rysunków i tabel

Rysunek 1. a). Globalny Bank Nasion na Svalbardzie, b). Nasiona przechowywane w Globalnym Banku Nasion na Svalbardzie Zdjęcia: Norwegian Ministry for Agriculture and Food; Źródło: <https://halospitsbergen.pl/ochrona-zasobow-genetycznych-jest-rownie-wazna-dla-wszystkich-krajow-biolog-asmund-asdal-o-globalnym-banku-nasion-na-svalbardzie/.....>13

Rysunek 2. Test kiełkowania tytoniu (a - kiełkowanie nasion na kiełkowniku Jacobsena, b - wyłożone nasiona, c - 7-dniowe siewki, d - klasyfikacja siewek na normalne - dolny rząd i nienormalne - górny rząd).31

Rysunek 3. Ocena szybkości kiełkowania, a - wyłożone nasiona, b - siewki tytoniu po 10 dniach, c - doświadczenie prowadzone w fitotronie.....33

Rysunek 4. Udział obiektów ze zdolnością kiełkowania $> 75\%$ w zależności od warunków przechowywania nasion a - nasiona *N. tabacum* przechowywane w warunkach niekontrolowanych b - nasiona *N. tabacum* i *N. rustica* przechowywane w stałej temperaturze i wilgotności.....37

Rysunek 5. Początkowa zdolność kiełkowania obiektów *N. tabacum* regenerowanych w IUNG-PIB, a przechowywanych w IHAR-PIB w latach 1981–2000 oraz zdolność kiełkowania tych obiektów testowana w 2014 roku. Ramka jest determinowana przez 25. i 75. percentyl, poprzeczna linia określa medianę. Wąsy są determinowane przez 5. i 95. percentyl (najniższa i najwyższa wartość, która nie odstaje od pozostałych), gwiazdki przez 1. i 99. percentyl (wartość minimalna i maksymalna).38

Rysunek 6. Początkowa zdolność kiełkowania obiektów *N. rustica* i *N. tabacum* regenerowanych w latach 1975-1991 w IPK oraz zdolność kiełkowania tych obiektów testowana w 1993 i 2013 roku. Ramka jest determinowana przez 25. i 75. percentyl, poprzeczną linię określa mediana. Wąsy są determinowane przez 5 i 95 percentyl (najniższa i najwyższa wartość, która nie odstaje od pozostałych), gwiazdki przez 1 i 99 percentyl (wartość minimalna i maksymalna).39

Rysunek 7. Udział obiektów ze zdolnością kiełkowania > 75% w zależności od warunków przechowywania. a - nasiona <i>N. tabacum</i> przechowywane w temperaturze 0°C; b - nasiona <i>N. tabacum</i> i <i>N. rustica</i> przechowywane w temperaturze -18°C.....	40
Rysunek 8. Charakterystyka rozkładu cech w populacji RIL Florida 301 x Hicks dla nasion kontrolnych i nasion poddanych sztucznemu starzeniu. Cechy wyrażone procentowo: udział wszystkich kiełkujących nasion (%TG) i zdolność kiełkowania (%NG). Pozycje rodziców na tle potomstwa oznaczono strzałkami.	41
Rysunek 9. Charakterystyka rozkładu cech T50 i AUC w populacji RIL Florida 301 x Hicks dla nasion kontrolnych i nasion poddanych sztucznemu starzeniu. Pozycje rodziców na tle potomstwa oznaczono strzałkami... ..	42
Rysunek 10. Lokalizacja QTL kontrolujących cechy związane z żywotnością nasion tytoniu. QTL dla nasion kontrolnych (C) i dla nasion postarzanych (CD) dla cech: liczba skielkowanych nasion (%TG–C, %TG–CD), zdolność kiełkowania (%NG–C, %NG–CD), czas potrzebny do skielkowania 50 % z wszystkich kiełkujących nasion (T50–C, T50–CD) oraz pole powierzchni pod krzywą czasu kiełkowania, po 200 h kiełkowania (AUC–C, AUC–CD). Wartości LOD podano pod strzałką.	44
Rysunek 11. Rozkład cech fenotypowych: TG (a), NG (b), T50 (c) i AUC (d) dla nasion kontrolnych (zielony) i dla nasion sztucznie postarzanych (pomarańczowy) w populacji Beinhart–1000 x Hicks. Przerywane linie oznaczają wartości średnie dla poszczególnych cech. Kolor brązowy oznacza wartości nakładające się.....	46
Rysunek 12. Rozmieszczenie QTL addytywnych (niepołączone niebieskie linie w wewnętrznym kole) i epistatycznych (połączone niebieskie linie w wewnętrznym kole). Niebieskie linie w zewnętrznym torze wskazują pozycje markerów na każdym chromosomie; czerwone paski w drugim okręgu to wartości LOD dla poszczególnych QTL. Niebieskie linie pod okręgiem wyznaczają przedział ufności QTL, a małe pionowe linie – pozycję szczytową. Kolorowe linie łączą różne bialleliczne epistatyczne regiony QTL (różowe – TG dla nasion kontrolnych; fioletowe – TG dla nasion po sztucznym postarzaniu).	48

Tabela 1. Największe kolekcje rodzaju <i>Nicotiana</i> na świecie w 2010 roku wg FAO	14
Tabela 2. Liczba obiektów <i>N. tabacum</i> i <i>N. rustica</i> wybranych do badań i zregenerowanych w IUNG-PIB i IPK (nasiona zdeponowano w przechowalniach średnio- i długoterminowych odpowiednio IHAR-PIB i IPK) w latach 1975-2000.....	29
Tabela 3. Charakterystyka QTL dla analizowanych cech: udział wszystkich kiełkujących nasion (%TG–C, %TG–CD), zdolność kiełkowania (%NG–C, %NG–CD), czas potrzebny do skielkowania 50% nasion w próbie (T50–C, T50–CD) oraz pole powierzchni pod krzywą po 200 h kiełkowania (AUC–C, AUC–CD) dla nasion kontrolnych (C) i nasion sztucznie postarzanych (CD).	43
Tabela 4. Charakterystyka QTL o działaniu addytywnym i epistatycznym dla nasion kontrolnych (C) i sztucznie postarzanych (CD) dla cech: liczba skielkowanych nasion (%TG–C, %TG–CD), zdolność kiełkowania (%NG–C, %NG–CD), czas potrzebny do skielkowania 50% nasion w próbie (T50–C, T50–CD) oraz pole powierzchni pod krzywą czasu kiełkowania po 200 h kiełkowania (AUC–C, AUC–CD).	47

11. Streszczeniu rozprawy doktorskiej w języku polskim

Streszczenie

Żywotność nasion tytoniu w zależności od warunków przechowywania i mapowanie QTL kontrolujących tę cechę

Słowa kluczowe: zasoby genowe, *Nicotiana*, bank genów, przechowywanie, żywotność nasion, QTL

Zasoby genowe roślin mają szczególne znaczenie dla zachowania różnorodności w środowisku przyrodniczym. Stanowią swojego rodzaju dziedzictwo ludzkości wobec zmniejszającej się systematycznie liczby gatunków występujących w świecie. Ochrona różnorodności genetycznej roślin jest zadaniem banków genów, gdzie materiał roślinny jest regenerowany z zachowaniem czystości genetycznej i utrzymywany w stanie żywym. Większość gatunków jest długotrwale przechowywana w postaci nasion. Należą do nich m. in. gatunki z rodzaju *Nicotiana*.

Celem prezentowanej rozprawy doktorskiej była ocena żywotności nasion obiektów należących do dwóch gatunków *Nicotiana tabacum* i *Nicotiana rustica*, które były przechowywane w zróżnicowanych warunkach temperatury i wilgotności. Ponadto przeprowadzono identyfikację regionów genetycznych QTL warunkujących długość życia nasion tytoniu. Nasiona poddane badaniom przechowywano w dwóch bankach genów: Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) w Gatersleben w Niemczech oraz w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych (KCRZG) znajdującym się w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowym Instytucie Badawczym (IHAR-PIB w Radzikowie), a także w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach (IUNG-PIB).

Porównano żywotność nasion *Nicotiana tabacum* i *Nicotiana rustica* przechowywanych w warunkach ściśle kontrolowanych w banku genów mieszczącym się w IPK oraz nasion obiektów *Nicotiana tabacum* przechowywanych w warunkach niepodlegających kontroli w laboratorium IUNG-PIB. W pierwszej lokalizacji nasiona utrzymywano przez okres od 2 do 12 lat w temperaturze $20,3 \pm 2,3^{\circ}\text{C}$ przy wilgotności $50,5 \pm 6,3\%$ RH. Natomiast w drugiej nasiona

przechowywane były przez taki sam czas, ale w temperaturze pokojowej 18–22°C przy wilgotności powietrza 45–60% RH.

Porównano również żywotność nasion obiektów *Nicotiana tabacum* przechowywanych przez okres dłuższy, tj. od 14 do 33 lat w papierowych torebkach w szklanych słoikach zamykanych próżniowo w temperaturze 0°C przy wilgotności nasion 4% w KCRZG IHAR-PIB oraz nasiona obiektów *Nicotiana tabacum* i *Nicotiana rustica* przechowywanych przez okres od 14 do 39 lat w hermetycznych szklanych słoikach w temperaturze -18°C przy wilgotności nasion 6% w banku genów IPK.

Nasiona *Nicotiana tabacum* i *Nicotiana rustica* charakteryzowały się zróżnicowaną żywotnością w zależności od warunków przechowywania. Wydaje się, że sezonowe wahania wilgotności powietrza miały decydujący wpływ na zmniejszenie żywotności nasion tytoniu przechowywanych w IUNG-PIB i szybszą utratę ich wigoru w porównaniu w tymi przechowywanymi w IPK. Natomiast czynnikiem różnicującym żywotność nasion przechowywanych w KCRZG IHAR-PIB i IPK była temperatura.

Zestawiając wyniki żywotności nasion uzyskane dla wszystkich trzech lokalizacji, stwierdzono, że czynnikiem o największym znaczeniu była temperatura przechowywania. Jej obniżenie z 20°C do 0°C wydłużyło okres przechowywania nasion średnio z 10 do 30 lat. Co więcej obniżenie temperatury z 0°C do -18°C wydłużyło czas przechowywania o kolejne 20 lat. Jako wartość progową przyjęto zdolność kiełkowania nasion powyżej 75%.

Do identyfikacji QTL dla cech związanych z żywotnością nasion wykorzystano dwie populacje mapujące tytoniu Florida 301 × Hicks oraz Beinhart–1000 × Hicks. Pod uwagę wzięto takie cechy jak: zdolność kiełkowania, procentowy udział wszystkich kiełkujących nasion, czas potrzebny do skiełkowania 50% nasion w próbie, parametr AUC (Area Under the Curve – pole powierzchni pod krzywą czasu kiełkowania, pomiędzy $t=0$ a zdefiniowanym przez użytkownika punktem końcowym $t=x$, wyznaczone po 200 godzinach kiełkowania). W populacji mapującej Florida 301 × Hicks zidentyfikowano 4 regiony genetyczne zlokalizowane na 4 chromosomach kontrolujących cztery cechy związane z żywotnością nasion tytoniu. Natomiast w populacji mapującej Beinhart–1000 × Hicks wykryto 23 regiony QTL o działaniu addytywnym, rozmieszczone na 11 chromosomach kontrolujące zmienność 4 badanych cech związanych z żywotnością nasion tytoniu. QTL o działaniu epistatycznym wykryto tylko dla cechy liczba skiełkowanych nasion. Dla nasion kontrolnych wykryto cztery pary QTL zlokalizowane na 4

chromosomach. W nasionach sztucznie postarzanych zidentyfikowano jedną parę zlokalizowaną na dwóch różnych chromosomach.

Uzyskane wyniki wykazały duże różnice w żywotności nasion tytoniu w zależności od warunków przechowywania oraz potwierdziły złożoność i poligeniczny charakter tej cechy. Informacje dotyczące żywotności nasion tytoniu mogą być pomocne w planowaniu programów dotyczących regeneracji obiektów kolekcji *Nicotiana* utrzymywanych w bankach genów.

12. Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku angielskim

Summary

Seed longevity in tobacco depending on storage conditions and QTL mapping controlling this trait

Keywords: genetic resources, *Nicotiana*, gene bank, storage, seed longevity, QTL

Plant genetic resources play an important role in preservation of biodiversity in the natural environment. They represent a form of humanity's heritage in light of the steadily declining number of species present in the world. The task of protecting plant genetic diversity is undertaken by gene banks, where plant material is regenerated while maintaining genetic purity and kept in a viable state. Most species are stored long-term in the form of seeds including species from the *Nicotiana* genus.

The aim of this doctoral dissertation was to assess the seed longevity of objects belonging to two species, *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana rustica*, which were stored under varying temperature and humidity conditions. Additionally, the identification of genetic regions QTL responsible for seed longevity in tobacco was carried out. The seeds were stored in two gene banks: the Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) in Gatersleben, Germany, and the National Centre for Plant Genetic Resources (KCRZG) located at the Plant Breeding and Acclimatization Institute – National Research Institute (IHAR-PIB) in Radzików as well as at the Institute of Soil Science and Plant Cultivation – National Research Institute (IUNG-PIB) in Puławy.

The seed longevity of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana rustica* stored under strictly controlled conditions at the gene bank located at the IPK was compared with the longevity of *Nicotiana tabacum* seeds stored under uncontrolled conditions in the IUNG-PIB laboratory. In the first location, the seeds were stored for a period of 2 to 12 years at a temperature of $20.3 \pm 2.3^{\circ}\text{C}$ and humidity of $50.5 \pm 6.3\%$ RH. In the second location, the seeds were stored for the same period, but at room temperature ($18\text{--}22^{\circ}\text{C}$) and air humidity of 45–60% RH.

The seed longevity of *Nicotiana tabacum* objects stored for a longer period, from 14 to 33 years in paper bags placed in vacuum-sealed glass jars (without air) at a temperature of

0°C and seed moisture content of 4% at the KCRZG IHAR-PIB, was also compared. Additionally, *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana rustica* seeds stored for a period of 14 to 39 years in hermetically sealed glass jars at a temperature of -18°C and seed moisture content of 6% in the IPK gene bank were analyzed.

The seed longevity of *Nicotiana tabacum* objects stored for a longer period, from 14 to 33 years in paper bags placed in vacuum-sealed glass jars at a temperature of 0°C and seed moisture content of 4% at the KCRZG IHAR-PIB, was also compared. Additionally, *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana rustica* seeds stored for a period of 14 to 39 years in hermetically sealed glass jars at a temperature of -18°C and seed moisture content of 6% in the IPK gene bank were analyzed.

The seeds of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana rustica* exhibited varying longevity depending on the storage conditions. It appears that seasonal fluctuations in air humidity had a significant impact on reducing the viability of tobacco seeds stored at IUNG-PIB, leading to a faster loss of vigor compared to those stored at IPK. On the other hand, the differentiating factor for the longevity of seeds stored at KCRZG IHAR-PIB and IPK was the temperature.

When comparing the seed longevity results obtained for all three locations, it was found that the most significant factor was the storage temperature. Reducing the temperature from 20°C to 0°C extended the seed storage period from an average of 10 to 30 years. Moreover, reducing the temperature from 0 to -18°C extended the storage period by an additional 20 years. A seed germination rate of over 75% was considered the threshold value for viability.

Two tobacco mapping populations, Florida 301 × Hicks and Beinhart–1000 × Hicks, were used to identify QTLs related to seed longevity traits. The traits considered included: germination capacity, percentage of all germinated seeds, time required to germinate 50% of seeds in the sample, and the Area Under the Curve (AUC) parameter, which measures the surface area under the germination time curve between $t=0$ and a user-defined endpoint $t=x$, calculated after 200 hours of germination.

In the Florida 301 × Hicks mapping population, four genetic regions located on four chromosomes were identified as controlling four traits associated with tobacco seed longevity. Meanwhile, in the Beinhart–1000 × Hicks population, 23 additive QTLs were detected, distributed across 11 chromosomes, controlling the variability of the four studied traits related to seed longevity. Epistatic QTLs were detected only for the trait number of germinated seeds.

In the control seeds, four QTL pairs located on four chromosomes were identified, while in artificially aged seeds, one pair was located on two different chromosomes.

The results obtained demonstrated significant differences in tobacco seed longevity depending on storage conditions and confirmed the complexity and polygenic nature of this trait. The information regarding tobacco seed longevity can be valuable in planning programs for the regeneration of *Nicotiana* collection accessions maintained in gene banks.