

Zróżnicowanie reakcji odpornościowej wybranych odmian tytoniu (*Nicotiana tabacum*) w zależności od użytego izolatu wirusa Y ziemniaka (PVY)

Anna Depta, Teresa Doroszevska, Anna Czubačka

Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, POLSKA

Abstrakt. Wirus Y ziemniaka (*Potato virus Y*, PVY) powoduje brunatną nekrozę nerwów liści tytoniu. W obrębie gatunku *Nicotiana tabacum* odporność na PVY warunkowana jest pojedynczym recesywnym genem *va* powstałym w wyniku delecji w genie podatności *Va*. Odporność tę posiada wiele odmian uprawnych tytoniu, jednak może być ona przełamana przez zjadliwe izolaty PVY, dlatego konieczne jest poszukiwanie nowych źródeł odporności lub łączenie czynników odporności już poznanych. Celem pracy była identyfikacja odmian mających odporność typu *va* oraz ocena jej skuteczności wobec czterech izolatów PVY, a także poszukiwanie nowych czynników odporności. Przebadano odporność 25 odmian tytoniu poprzez wykonanie testów biologicznych metodą inokulacji izolatami PVY w warunkach szklarniowych oraz zastosowanie testu DAS-ELISA w celu potwierdzenia obecności wirusa w inokulowanych roślinach. Identyfikację genu *va* prowadzono metodą PCR poprzez amplifikację dwóch markerów genu podatności *Va*. W odmianach posiadających gen odporności *va* nie dochodziło do amplifikacji produktów. Najwyższą odpornością charakteryzowała się odmiana VAM, która nie została porażona słabszymi izolatami, chociaż izolaty silnie spowodowały nekrozę nerwów. Niższą odpornością cechowało się 6 odmian, które nie wykazały objawów chorobowych po zastosowaniu izolatu słabego. Pozostałe odmiany posiadające czynnik typu *va* zostały porażone przez wszystkie izolaty. Kolejnych pięć odmian, posiadających gen podatności *Va*, wykazało objawy tolerancji na zakażenie użytymi izolatami PVY. Odmiana Węgierski Ogrodowy, pomimo obecności genu podatności (*Va*), nie została porażona przez izolat słaby.

słowa kluczowe: izolaty PVY, gen *va*, tolerancja

WSTĘP

Tytoń uprawny (*Nicotiana tabacum*) to jedna z ważniejszych roślin przemysłowych uprawianych w Polsce i na świecie. Duże zagrożenie dla uprawy tytoniu stanowią patogeny wirusowe, w tym wirus Y ziemniaka (*Potato Virus Y*, PVY). Objawy chorobowe powodowane przez ten wirus mogą obejmować przejaśnienia nerwów i plamy chlorotyczne blaszki liściowej, a przede wszystkim nekrozę nerwów (Doroszevska, 2004), przy czym nasilenie symptomów zależy od rodzaju odporności odmiany oraz od zjadliwości izolatu wirusa.

Wirus Y ziemniaka należy do rodzaju *Potyvirus* i rodziny *Potyviridae* (Scholthof i in., 2011), a jego genom składa się z pojedynczej, sensownej nici RNA o długości 9700 nukleotydów (Robaglia i in., 1989; Thole i in., 1993). Duża różnorodność izolatów wirusa jest przede wszystkim skutkiem wysokiego współczynnika błędów replikacji polimerazy RNA zależnej od RNA, czego efektem są mutacje punktowe. Różnorodność jest też wynikiem licznych rekombinacji pomiędzy izolatami (Drake, 1993; Przybyś i in., 2013). Ze względu na objawy wywoływane na tytoniu i ziemniaku, izolaty PVY zostały podzielone na trzy grupy: PVY^O, PVY^C, PVY^N. W uprawie tytoniu izolaty z grup PVY^O i PVY^C powodują słabe objawy w postaci mozaiki, zaś największe zagrożenie stanowią izolaty z grupy PVY^N, które wywołują nekrozy nerwów liści tytoniu. Na podstawie objawów wywołanych na ziemniaku, grupę PVY^N podzielono na izolaty PVY^{NW} wywołujące słabe objawy mozaiki na liściach oraz PVY^{NTN} powodujące nekrozę bulw (Chrzanowska, 1994; Le Romancer i in., 1994). Proste rozróżnienie grup PVY^{NW} i PVY^{NTN} jest możliwe dzięki zastosowaniu dwóch typów przeciwciał produkowanych przez firmę Bioreba (Przybyś i in., 2013).

Cykl infekcyjny potywirusów zależy od interakcji pomiędzy wirusowym białkiem VPg (Viral genome-associated Protein) a eukariotycznym czynnikiem inicjacji trans-

Autor do kontaktu:

Anna Depta
e-mail: adepta@iung.pulawy.pl
tel. +48 81 4786 935

lacji eIF4E i form izomerycznych tych białek (Robaglia, Caranta, 2006; Wittmann i in., 1997). Delecja powodująca odporność na PVY w tytoniu, określana jako *va*, dotyczy genu *eIF4E1-S* pochodzącego od rodzicielskiego gatunku *Nicotiana sylvestris*. Według Acosta-Leala i Xionga (2008) gen *va* nie zapobiega infekcji wirusowej w roślinie, ale ogranicza przemieszczanie się wirusa z komórki do komórki, co uniemożliwia infekcję systemiczną. Niestety ten rodzaj odporności jest przełamany przez niektóre izolaty wirusa Y ziemniaka (RB PVY – Resistance-Breaking PVY). Białko VPg tych izolatów wchodzi w interakcje z białkiem eIF4E1-S, jak również w mniejszym stopniu z eIF(iso)4E-T (Takakura i in., 2018). Izolaty RB PVY charakteryzują się mutacją w pozycji 105, gdzie lizyna jest zastąpiona przez kwas glutaminowy (K105E). Ta mutacja została odnaleziona w izolatach RB PVY w Japonii (Masuta i in., 1999) i w Europie (Janzac i in., 2014; Przybyś i in., 2013). Poza mutacją K105E, występują również mutacje S101G i V108I, a izolaty je posiadające przełamują odporność warunkowaną wszystkimi trzema formami allelicznymi genu *va* (Janzac i in., 2014).

Jedyną skuteczną metodą ograniczenia występowania PVY jest uprawa form odpornych. Ze względu na dużą zmienność wirusa i zdolność do przełamania istniejącej odporności konieczne jest poszukiwanie nowych źródeł odporności oraz łączenie już poznanych. Największy zasób genów odporności na czynniki chorobotwórcze mają dzikie gatunki *Nicotiana* (Doroszevska, Depta, 2011; Głazewska, 1977; Sievert, 1972). Form odpornych poszukuje się również w obrębie odmian uprawnych *Nicotiana tabacum*. Odmiana VAM powstała w wyniku działania promieni X (Koelle, 1961) i zawiera recesywny gen odporności *va*, który jest zlokalizowany na chromosomie E (Gupton, Burk, 1973). Za pomocą markerów RAPD (Noguchi i in., 1999) stwierdzono, że delecja w odmianie VAM ma wielkość 1 Mbp. Na podstawie odporności odmian na japoński izolat PVY-T wyodrębniono trzy alleliczne formy genu *va*: *va0*, *va1*, *va2* (Blancard i in., 1994; Yamamoto, 1992). Odporność typu *va* występuje również w wielu odmianach tytoniu, które powstały na drodze hodowli. Przykładem jest m.in. polska odmiana Wiślica posiadająca allel *va1* (Verrier, Doroszevska, 2004) i Virginia SCR posiadająca allel *va2* (Ano i in., 1995; Carstens, Seehofer, 1960).

Celem przeprowadzonych badań było określenie charakteru odporności odmian tytoniu na PVY, identyfikacja odmian mających odporność typu *va* oraz ocena skuteczności tej odporności w zależności od użytego izolatu PVY. Badania obejmowały też poszukiwanie innych czynników odporności w obrębie odmian *Nicotiana tabacum*. Uwzględniono przede wszystkim wybrane odmiany polskie należące do typu papierosowego jasnego, ale również inne odmiany, co do których istniały przesłanki sformułowane na podstawie doniesień literaturowych oraz obserwacji polowych, że posiadają pewien stopień odporności na wirus Y ziemniaka (PVY).

MATERIAŁY I METODY

Materiał roślinny

W badaniach uwzględniono 25 odmian tytoniu uprawnego *Nicotiana tabacum*, spośród których 18 należy do typu jasnego suszonego ogniowo-rurowo, 2 do jasnego suszonego powietrzem, 4 to odmiany ciemne suszone powietrzem oraz jedna suszona na słońcu. Większość, tj. 17 obiektów, stanowiły odmiany polskie. Jako pozytywny obiekt kontrolny świadczący o skuteczności inokulacji wykorzystano wysoce podatną na PVY odmianę Samsun H. Badania prowadzono w warunkach szklarniowych. Nasiona poszczególnych odmian wysiano do palet wielokomorowych, a następnie wysadzono po 24 rośliny z każdego obiektu pojedynczo do odpowiednich doniczek.

Badania biologiczne

Celem badań biologicznych była ocena stopnia odporności odmian tytoniu na wirus Y ziemniaka. Testy wykonano metodą inokulacji w warunkach szklarniowych. Inokulację prowadzono, kiedy rośliny znajdowały się w stadium 5-6 liści. Do badań wykorzystano 4 izolaty wirusa Y ziemniaka o zróżnicowanym stopniu zjadliwości:

- **IUNG 23** (określany jako izolat słaby). Nie przełamuje odporności typu *va* u odmian VAM, Wiślica i V. SCR. Nie jest wykrywany przez przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw serotypowi nekrotycznemu (MoAbs anti Y^N, Bioreba) i zaliczany jest do grupy izolatów PVY^{NW}.
- **IUNG 17** (określany jako izolat średni). Nie poraża odmiany VAM, ale przełamuje odporność Wiślicy i V. SCR, powodując nekrozy nerwów. Nie jest wykrywany przez przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw serotypowi nekrotycznemu (MoAbs anti Y^N, Bioreba) i zaliczany jest do grupy izolatów PVY^{NW}.
- **IUNG 22** (określany jako izolat silny). Przełamuje odporność typu *va* odmian VAM, Wiślica i V. SCR, powodując nekrozy nerwów. Nie jest wykrywany przez przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw serotypowi nekrotycznemu (MoAbs anti Y^N, Bioreba) i zaliczany jest do grupy izolatów PVY^{NW}.
- **IUNG 20** (określany jako izolat silny). Przełamuje odporność typu *va* u odmian VAM, Wiślica i V. SCR, powodując nekrozy nerwów. Wykrywalny przez dwa rodzaje przeciwciał firmy Bioreba, co oznacza, że należy do serotypu nekrotycznego i zaliczany jest do grupy izolatów PVY^{NTN}.

W celu uzyskania inokulum liście porażonych odpowiednim izolatem roślin podatnej odmiany Samsun H rozcierano w moździerzu, a następnie uzyskanym sokiem pocierano posypane karborundem rośliny przeznaczone do testowania. Do badań przeznaczono po 24 rośliny poszczególnych odmian, przy czym każdym z izolatów zakażano po 6 roślin. Zakażane rośliny chroniono przez 48 godzin

Tabela 1. Typ użytkowy i pochodzenie 25 odmian tytoniu (*Nicotiana tabacum*) badanych pod względem odporności na wirus Y ziemniakaTable 1. Type and origin of 25 tobacco cultivars (*Nicotiana tabacum*) tested for resistance to PVY.

Odmiana Cultivar	#Typ użytkowy Type	Hodowca Breeder
Samsun H	Suszony na słońcu Sun-cured (Samsun)	Instytut Tytoniowy w Bergerac; Francja
Bachus	Jasny suszony powietrzem Light air-cured (Burley)	Ośrodek Hodowli Tytoniu w Kazimierzy Wielkiej; Polska
Havana 307	Ciemny suszony powietrzem (Cygarowy) Dark air-cured (Cigar)	Gembloux; Belgia
Havana II C	Ciemny suszony powietrzem (Cygarowy) Dark air-cured (Cigar)	Instytut w Forchheim; Niemcy
Krak	Ciemny suszony powietrzem Dark air-cured (Kentucky)	Universal Leaf Tobacco Poland; Jędrzejów; Polska
Prezydent	Jasny suszony powietrzem Light air-cured (Puławski)	Centralne Laboratorium Przemysłu Tytoniowego; Kraków; Polska
VAM	Jasny suszony ogniowo-rurowo Light flue-cured (Virginia)	Instytut Tytoniowy w Bergerac; Francja
Wiślica	Jasny suszony ogniowo-rurowo Light flue-cured (Virginia)	Centralne Laboratorium Przemysłu Tytoniowego; Kraków (Ośrodek Doświadczalny Hodowli i Uprawy Tytoniu w Skroniowie); Polska
Wiecha	Jasny suszony ogniowo-rurowo Light flue-cured (Virginia)	Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa; Puławy; Polska
V. SCR	Jasny suszony ogniowo-rurowo Light flue-cured (Virginia)	Instytut Tytoniowy w Bergerac; Francja
Wiktoria	Jasny suszony ogniowo-rurowo Light flue-cured (Virginia)	Centralne Laboratorium Przemysłu Tytoniowego; Kraków; Polska
Weneda	Jasny suszony ogniowo-rurowo Light flue-cured (Virginia)	Universal Leaf Tobacco Poland; Jędrzejów; Polska
Wilga	Jasny suszony ogniowo-rurowo Light flue-cured (Virginia)	Centralne Laboratorium Przemysłu Tytoniowego; Kraków (Ośrodek Doświadczalny Hodowli i Uprawy Tytoniu w Skroniowie); Polska
Wiera	Jasny suszony ogniowo-rurowo Light flue-cured (Virginia)	Universal Leaf Tobacco Poland; Jędrzejów; Polska
Warta	Jasny suszony ogniowo-rurowo Light flue-cured (Virginia)	Centralne Laboratorium Przemysłu Tytoniowego; Kraków (Ośrodek Doświadczalny Hodowli i Uprawy Tytoniu w Skroniowie); Polska
Wika	Jasny suszony ogniowo-rurowo Light flue-cured (Virginia)	Universal Leaf Tobacco Poland; Jędrzejów; Polska
Wanda	Jasny suszony ogniowo-rurowo Light flue-cured (Virginia)	Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa; Puławy; Polska
Wisana	Jasny suszony ogniowo-rurowo Light flue-cured (Virginia))	Universal Leaf Tobacco Poland; Jędrzejów; Polska
Złotolistny IHAR	Jasny suszony ogniowo-rurowo Light flue-cured (Virginia)	Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa; Puławy; Polska
LB Koro	Jasny suszony ogniowo-rurowo Light flue-cured (Virginia)	Lubelska Wytwórnia Tytoniu Przemysłowego, Surhów; Polska
Virginia Gold Dolar	Jasny suszony ogniowo-rurowo Light flue-cured (Virginia)	USA
Virginia 278	Jasny suszony ogniowo-rurowo Light flue-cured (Virginia)	Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa; Puławy; Polska
Zamojska 4	Jasny suszony ogniowo-rurowo Light flue-cured (Virginia)	Centralne Laboratorium Przemysłu Tytoniowego; Kraków; Polska
Virginia Joyner	Jasny suszony ogniowo-rurowo Light flue-cured (Virginia)	USA
Węgierski Ogrodowy	Ciemny suszony powietrzem Dark air-cured	Węgry

typy użytkowe wg Doroszevska, Berbec (2015)

przed bezpośrednim wpływem światła słonecznego. Przeprowadzono obserwacje i dokumentację objawów chorobowych po 7, 14, 21 i 28 dniach od zakażenia.

Testy serologiczne

W celu potwierdzenia obecności wirusa w badanych roślinach przeprowadzono testy serologiczne metodą DAS-ELISA z użyciem przeciwciał firmy Bioreba skierowanych przeciwko różnym szczepom wirusa Y (MoAbs anti Y) – IgG112911. Testy zostały wykonane po 4 tygodniach od zakażenia. Próby stanowiły fragmenty liści badanych roślin, które homogenizowano z buforem ekstrakcyjnym, a następnie homogenizat aplikowano na mikropłytkę uprzednio opłaszczoną przeciwciałem. Koniuugat stanowiły przeciwciała związane z fosfatazą alkaliczną, zaś jako substrat zastosowano pNPP (p-Nitro Phenyl Phosphate; fosforan p-nitrofenylu). Pomiar absorbancji przy długości fali 405 nm był wykonany z użyciem czytnika płytek Tecan Sunrise po 30 i 45 minutach od naniesienia substratu. Kontrola negatywna została dostarczona przez producenta, zaś kontrolę pozytywną stanowiła podatna odmiana Samsun H.

Testy molekularne

Ze względu na to, że odporność typu *va* jest warunkowana delecją w genie podatności *Va*, wykrywanie genu odporności prowadzono pośrednio poprzez detekcję genu podatności. Analizy molekularne prowadzono metodą PCR, a o obecności genu *va* wnioskowano na podstawie braku amplikonów.

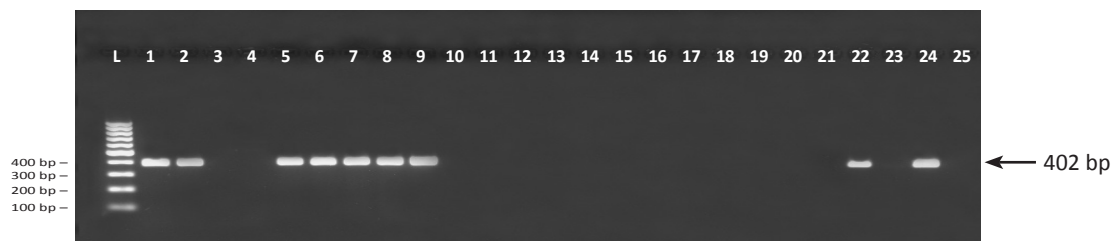
Izolację genomowego DNA wykonano metodą Doyle'a i Doyle (1987) z użyciem CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide; bromek cetylotrimetyloamoniowy). Oczyszczone i wysuszone DNA zawieszono w sterylnej wodzie destylowanej. Do amplifikacji DNA zastosowano reakcję PCR wykorzystując primery opisane przez Julio i in. (2015) oraz Sierró i in. (2014). Zastosowanie pary primerów **S10760 E1-F** (5'-AAATTGGATGAATCTGATG-3') i **S10760 E1-2R** (5'-GTTTCGCGAAGGGA-ACTGC-3') pozwoliło na amplifikację produktu o dłu-

gości **146 bp**, a przy użyciu primerów **Nsyl-eIF4E1-F** (5'-AATGCTTATTGTTAGCCTTTGTTTCT-3') i **Nsyl-eIF4E1-R** (5'-GTCAAGTGGCAGCCTTTCATA-3') uzyskano produkt o długości **402 bp**. Mieszanina reakcyjna do PCR o objętości 10 µl zawierała 1 µl roślinnego DNA o stężeniu 20 ng/µl oraz 6 µl buforu True Allele PCR Premix (Applied Biosystems) zawierającego polimerazę oraz po 0,15 µl każdego z pary primerów o stężeniu 10 mM oraz 2,7 µl wody sterylnej MiliQ. Reakcja PCR obejmowała denaturację wstępną przez 10 minut w 95°C, 44 cykle o następującym profilu: 1 minuta w 95°C, 1 minuta w 64°C oraz 2 minuty w 72°C oraz końcową elongację przez 7 minut w 72°C. Produkt PCR był analizowany w 1,5% żelu agarozowym w buforze 1xTBE (100 mM Tris, 90 mM H₃BO₃, 1 mM EDTA, pH 8,5), a wizualizację wyników rozdziału elektroforetycznego przeprowadzono w transiluminatorze w świetle UV.

WYNIKI

Badane odmiany tytoniu uprawnego *Nicotiana tabacum* wykazały zróżnicowany stopień podatności na wirus Y ziemniaka w zależności od użytego izolatu (tab. 2). Przeprowadzone badania molekularne pozwoliły podzielić obiekty pod względem obecności genu podatności *Va* na dwie główne grupy. Pierwsza obejmowała 16 odmian, które nie amplifikowały produktów o długości 146 i 402 par zasad, co oznacza delecję w obrębie genu podatności na wirus Y ziemniaka. Drugą grupę stanowiły odmiany, u których obecność amplikonów świadczy o posiadaniu genu podatności na PVY (ryc. 1).

W obrębie typu odporności określanego jako *va*, obiekty wykazywały zróżnicowany stopień odporności w zależności od użytego izolatu. Najwyższą odpornością charakteryzowała się odmiana VAM, która nie uległa porażeniu izolatami: IUNG 23 i IUNG 17. Świadczył o tym brak objawów chorobowych i negatywne wyniki testów immunoenzymatycznych. Natomiast izolaty określane jako silne spowodowały u niej nekrozę nerwów (ryc. 2), a testy DAS-ELISA dały wynik pozytywny.



1 – Virginia 278; 2 – Virginia Joyner; 3 – Havana IIC; 4 – Havana 307; 5 – Złotolistny IHAR; 6 – Węgierski Ogrodowy; 7 – LB Koro; 8 – Virginia Gold Dolar; 9 – Zamojska 4; 10 – Wiktoria; 11 – Wisana; 12 – Wiera; 13 – Weneda; 14 – Wanda; 15 – Warta; 16 – Wilga; 17 – Wiecha; 18 – Wika; 19 – Krak; 20 – VAM; 21 – Wiślica; 22 – Samsun H; 23 – Bachus; 24 – Prezydent; 25 – V. SCR, L – marker wielkości DNA; DNA ladder

Rycina 1. Elektroforetyczna analiza produktów amplifikacji markera **Nsyl-eIF4E1** (produkt o wielkości 402 bp) w odmianach tytoniu
Figure 1. Electrophoretic analysis of PCR products (402 bp) covering marker **Nsyl-eIF4E1** in tobacco cultivars.

Tabela 2. Obecność markerów związanych z genem *Va* podatności na PVY w odmianach tytoniu oraz reakcja odpornościowa roślin i wynik testu DAS-ELISA po zakażeniu czterema izolatami PVYTable 2. The presence of markers associated with *Va* susceptibility gene in tobacco cultivars. Plant reaction and DAS-ELISA result to inoculation with four PVY isolates.

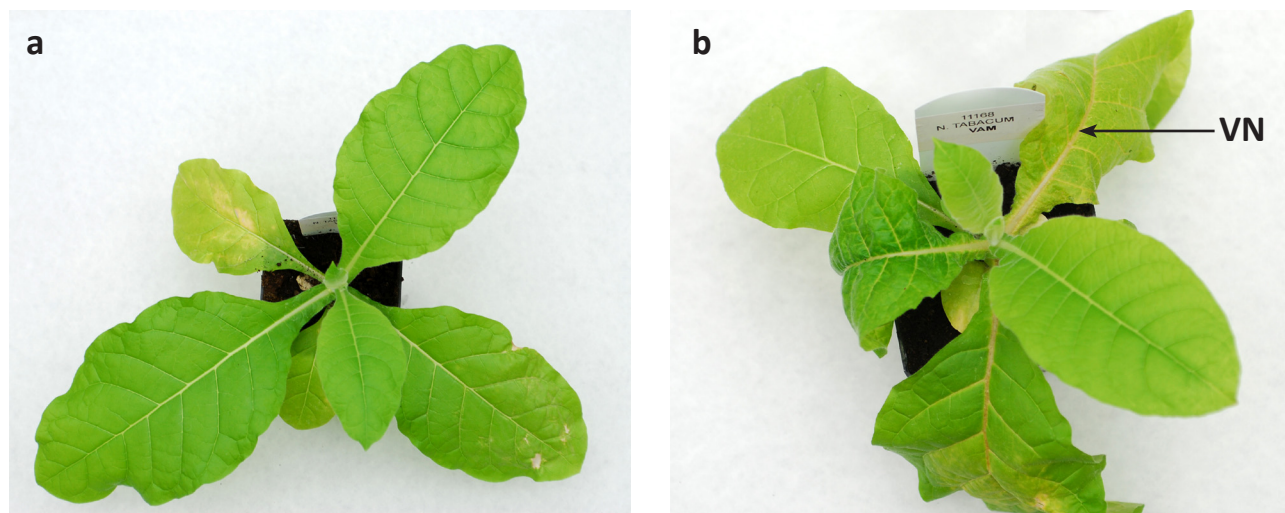
Odmiana Cultivar	Obecność markerów Presence of markers S10760E1 /Nsy1-eIF4E1	Reakcja roślin na inokulację izolatami PVY oraz wynik testu DAS-ELISA Plant reaction to inoculation with PVY isolates and result of DAS-ELISA							
		IUNG 23		IUNG 17		IUNG 22		IUNG20	
VAM	-/-	ns	-	ns	-	VN	+	VN	+
Wiślica	-/-	ns	-	VN	+	VN	+	VN	+
Wiecha	-/-	ns	-	VN	+	VN	+	VN	+
Bachus	-/-	ns	-	VN	+	VN	+	VN	+
V. SCR	-/-	ns	-	VN	+	VN	+	VN	+
Wiktoria	-/-	ns	-	VN	+	VN	+	VN	+
Weneda	-/-	ns	-	VN	+	VN	+	VN	+
Havana 307	-/-	VN	+	VN	+	VN	+	VN	+
Havana II C	-/-	VN	+	VN	+	VN	+	VN	+
Wilga	-/-	VN	+	VN	+	VN	+	VN	+
Krak	-/-	VN	+	VN	+	VN	+	VN	+
Wiera	-/-	VN	+	VN	+	VN	+	VN	+
Warta	-/-	VN	+	VN	+	VN	+	VN	+
Wika	-/-	VN	+	VN	+	VN	+	VN	+
Wanda	-/-	VN	+	VN	+	VN	+	VN	+
Wisana	-/-	VN	+	VN	+	VN	+	VN	+
Złotolistny IHAR	+/+	VC, CS	+	VC, CS	+	VC, CS	+	VC	+
LB Koro	+/+	VC, CS	+	VC, CS	+	VC, CS	+	VC	+
Virginia Gold Dolar	+/+	VC, CS	+	VC, CS	+	VC, CS	+	VC	+
Virginia 278	+/+	VC, CS	+	VC, CS	+	VC, CS	+	VC	+
Zamojska 4	+/+	VC, CS	+	VC, CS	+	VC, CS	+	VC	+
Prezydent	+/+	VN	+	VN	+	VN	+	VN	+
Virginia Joyner	+/+	VN	+	VN	+	VN	+	VN	+
Samsun H	+/+	VN	+	VN	+	VN	+	VN	+
Węgierski Ogrodowy	+/+	ns	-	VC, CS	+	VN	+	VN	+

Objawy chorobowe: ns – bez objawów, VN – nekrozy nerwów, CS – chlorotyczne plamy, VC – przejaśnienia nerwów;

(+) pozytywny, (-) negatywny wynik testu DAS-ELISA

Disease symptoms: ns – no symptoms, VN – vein necrosis, CS – chlorotic spots, VC – vein clearing;

(+) positive, (-) negative result of DAS-ELISA test



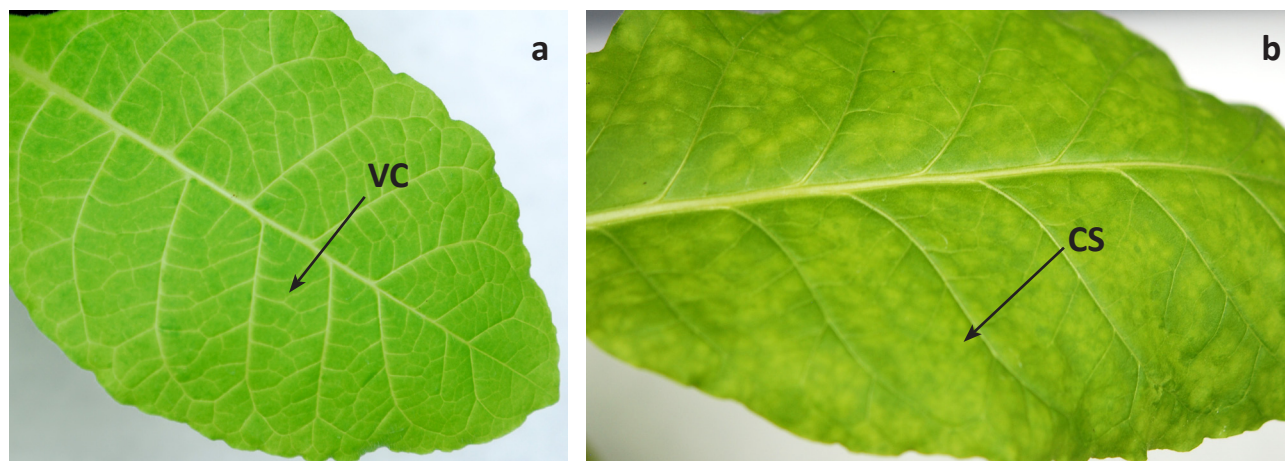
Rycina 2. Reakcja tytoniu odmiany VAM na dwa izolaty PVY (IUNG 23 i IUNG 20): brak objawów chorobowych po zastosowaniu słabego izolatu (a) i nekrozy nerwów po zastosowaniu izolatu silnego (b)

Figure 2. Reaction of tobacco cv. VAM to inoculation with two PVY isolates (IUNG 23 and IUNG 20): no symptoms observed after applying the mild isolate (a) and vein necrosis as a result of applying the strong isolate (b).

Poza odmianą VAM wśród obiektów posiadających recesywny gen *va* sześć odmian: Wiecha, Bachus, Wiktorija, Weneda, Wiślica i V. SCR również nie wykazywało objawów chorobowych po zastosowaniu izolatu IUNG 23, a wykonane dla nich testy DAS-ELISA były negatywne. Pozostałe izolaty spowodowały na tych odmianach wystąpienie nekrozy nerwów, a porażenie było potwierdzone pozytywnymi wynikami testu DAS-ELISA. Dziewięć odmian: Havana 307, Havana IIC, Wilga, Krak, Wiera, War-

ta, Wika, Wanda i Wisana, posiadających odporność typu *va*, zostało porażonych przez wszystkie zastosowane izolaty wirusa Y ziemniaka powodujące wystąpienie nekrozy nerwów.

Drugą grupę stanowiły odmiany posiadające gen podatności *Va*. W obrębie tych odmian znajdowało się pięć (Złotolistny IHAR, LB Koro, Virginia Gold Dolar, Virginia 278 oraz Zamojska 4), które po inokulacji czterema izolatami wirusa wykazywały jedynie przejaśnienia nerwów



Rycina 3. Reakcja odmian tolerancyjnych tytoniu (na przykładzie odm. Virginia Gold Dolar) na porażenie wirusem Y ziemniaka w postaci przejaśnień nerwów (VC – Vein Clearing) (a) i plam chlorotycznych (CS – Chlorotic Spots) (b) niezależnie od użytego izolatu
Figure 3. Response of tolerant tobacco cultivars (e.g. cv. Virginia Gold Dolar) to PVY infection observed as vein clearing (a) and chlorotic spots (b) independently from a used isolate.

i plamy chlorotyczne, bez nekrozy nerwów. Wirus był wykrywany w tkankach roślin za pomocą DAS-ELISA i analizy molekularne potwierdziły obecność genu podatności na PVY. Odmiany te określono jako tolerancyjne (ryc. 3).

Odmiany: Prezydent, Virginia Joyner i Samsun H, posiadające gen podatności *Va* i reagujące na inokulację wszystkimi użytymi izolatami PVY wystąpieniem nekrozy nerwów, określono jako podatne.

Bardzo interesujące wyniki uzyskano w przypadku odmiany Węgierski Ogrodowy, która w zróżnicowany sposób zareagowała na użyte izolaty. Izolat IUNG 23 nie spowodował wystąpienia objawów chorobowych, a testy immunoenzymatyczne nie wykazały obecności wirusa w roślinie. Z kolei izolat IUNG 17 wywołał przejaśnienia nerwów i plamy chlorotyczne, zaś inokulacja izolatami IUNG 22 i IUNG 20 skutkowała nekrozami nerwów, a obecność wirusa została potwierdzona pozytywnymi wynikami testu DAS-ELISA. Jednocześnie stwierdzono, że odmiana Węgierski Ogrodowy posiada gen podatności *Va*.

DYSKUSJA

Wyniki wskazują na zróżnicowany stopień podatności badanych odmian tytoniu na wirus Y ziemniaka w zależności od podłoża genetycznego rośliny oraz od użytego izolatu PVY. Poprzez analizy molekularne wyodrębniono dwie zasadnicze grupy. W pierwszej grupie znalazło się 16 odmian, w których nie stwierdzono amplifikacji produktów specyficznych dla genu podatności *Va*, co może świadczyć o wystąpieniu delekcji w tym regionie genomu i tym samym o obecności recesywnego genu odporności *va*.

W obrębie tej grupy odmian zaobserwowano jednak duże zróżnicowanie w reakcji na PVY w zależności od użytego izolatu. Do podgrupy pierwszej zaliczono tylko odmianę VAM, która charakteryzowała się najwyższą odpornością, gdyż nie wykazywała objawów chorobowych po zakażeniu izolatami określanymi jako słaby i średni. Uległa jedynie porażeniu przez izolaty silne. Badania Masuty i in. (1999) wykazały, że odmiana VAM była wysoce odporna na większość zastosowanych izolatów japońskich i tolerancyjna na trzy izolaty PVY-T. Również inokulacja 29 izolatami polskimi, wśród których 17 należało do grupy PVY^{NW}, a 12 do PVY^{NTN} wykazała, że spośród pięciu badanych obiektów tytoniu, odmiana VAM miała najwyższą odporność (Doroszewska, Czubačka, 2008). Acosta-Leal i Xiong (2008) twierdzą, że odporność odmiany VAM, warunkowana jest w rzeczywistości dwoma genami recesywnymi *va* i *va2*. Pierwszy z nich ogranicza przemieszczanie się wirusa z komórki do komórki, a drugi zapobiega akumulacji wirusa w tkance liściowej.

Drugą podgrupę stanowiło sześć odmian, które nie wykazywały objawów chorobowych po zastosowaniu izolatu słabego. Pozostałe trzy izolaty spowodowały u tych odmian wystąpienie nekrozy nerwów. Kolejna podgru-

pa posiadająca gen odporności *va* została porażona przez wszystkie użyte izolaty wirusa Y ziemniaka, wykazując nekrozę nerwów. Brak skutecznej odporności może być efektem niewielkiej delekcji, niewystarczającej do ochrony przed wirusem, o czym donosili już inni badacze (Julio i in., 2015; Michel i in. 2019).

Użyte w niniejszej pracy trzy odmiany VAM, Wiślica i V. SCR posiadające zdefiniowaną odporność typu *va*, były przedmiotem badań Korbeckiej-Glinki i in. (2017b), w których były inokulowane 10 izolatami PVY. Najwyższą odpornością (podobnie jak w prezentowanych testach) charakteryzowała się odmiana VAM, która uległa porażeniu przez cztery izolaty z grupy PVY^{NTN} i jeden z grupy PVY^{NW}. Odmiana Wiślica została porażona łącznie sześcioma izolatami. Najniższą odporność w cytowanej pracy wykazała odmiana V. SCR, która zareagowała objawami chorobowymi na 9 izolatów.

Julio i in. (2015) inokulowali izolatami z grupy PVY^N 163 obiekty *Nicotiana tabacum* i jednocześnie wykonali analizy roślin, wykrywając w nich obecność markerów molekularnych, w tym S10760. Ich badania wykazały, że 118 obiektów amplifikowało wykrywane markery i wykazywało objawy chorobowe, zaś 45 uznano za odporne. W obrębie odmian odpornych wyodrębniono trzy grupy. Pierwsza to odmiany, w których nie zostały zamplikowane żadne z zastosowanych markerów, co może świadczyć o dużej delekcji w obrębie genu *Va*. Druga grupa to obiekty, które nie amplifikowały markera S10760, ale amplifikowały pozostałe, co wskazywało na mniejszą delekcję. Trzecia grupa nie miała objawów chorobowych, ale wykryto obecność wszystkich markerów. Szczegółowe badania tej grupy wykazały delekcję obejmującą 2 pary zasad w pozycji 478-479.

Trwałość odporności warunkowanej przez różne typy mutacji w obrębie genu *eIF4E* była przedmiotem badań Michela i in. (2019). Na podstawie wyników uzyskanych wcześniej przez Julio (2015) wybrano obiekty należące do wspomnianych wcześniej grup. Grupa pierwsza (LD – Large Deletion) odpowiadała odmianom posiadającym delekcję na chromosomie 21. o wielkości 1 Mbp i obejmowała odmiany VAM, Wiślica, TN86 i PBD6. Grupa druga (SD – Small Deletion) obejmowała odmiany tytoniu Elka 245, Little C i Philippin oraz badaną również w niniejszej pracy Wikę, posiadające na chromosomie 21. mniejszą delekcję. W grupie trzeciej (FS – Frameshift) znalazły się odmiany Burley DC, Semoy, Skro.L56 posiadające delekcję o wielkości 2 par zasad w obrębie genu *eIF4E-1*, co powodowało skrócenie C-końcowego odcinka białka liczącego 163 aminokwasy. Badano również mutanty (EMS-1 i EMS-2) otrzymane przy użyciu metanosulfonianu etylu, u których następowało skrócenie na C-końcu białek zawierających tylko 50 lub 53 aminokwasy (odpowiednio). Uzyskane przez Michela i in. (2019) wyniki wskazały na zróżnicowaną reakcję tytoniu na PVY w zależności od wielkości

delecji. Najmniejszy udział roślin zawierających wirus wykazano wśród odmian z grupy LD, w tym najwyższą odpornością charakteryzowała się odmiana VAM, następnie TN86 i Wiślica, zaś najmniej odporną odmianą w tej grupie była PBD6. Podobne wyniki oceny odporności tych odmian uzyskano w wieloletnich badaniach międzynarodowych realizowanych w ramach CORESTA zarówno w infekcjach w warunkach naturalnych w różnych krajach, jak też w wyniku inokulacji (Verrier, Doroszewska, 2018). W badaniach Michela i in. (2019) większy udział roślin z wirusem zanotowano w obrębie odmian z grupy SD, FS i EMS. Analiza genetyczna i transkryptomyczna wykazała, że trwałość odporności jest silnie związana z kompleksem genetycznym zlokalizowanym na chromosomie 14., który zawiera trzy inne geny: *eIF4E-2*, *eIF4E-3* i *eIF4E-4*. Należą one do genomu T, który pochodzi od gatunku rodzicielskiego *Nicotiana tomentosiformis*. Odporność na PVY jest najtrwalsza przy braku genu *eIF4E-1*. Wówczas dochodzi do nadekspresji genu kodującego białko *eIF4E-2*, z którym wirus tworzy niefunkcjonalne połączenia. Badania wskazują, że poziom ekspresji genu *eIF4E-2* jest pozytywnie skorelowany z trwałością odporności. Silna nadekspresja tego genu może zapobiegać porażaniu przez izolaty przełamujące odporność (RB PVY).

Drugą zasadniczą grupę w naszych badaniach stanowiły odmiany posiadające gen podatności *Va*, o czym świadczyła obecność produktów PCR o wielkości 146 i 402 par zasad. Ta grupa również nie była jednorodna. W grupie tej wyodrębniono podgrupę pięciu odmian tolerancyjnych, które niezależnie od użytego izolatu wirusa wykazywały przejaśnienia nerwów i plamy chlorotyczne, ale bez nekroz, przy czym wzrost i rozwój roślin inokulowanych był zbliżony do zdrowych. Michel i in. (2018) wskazują, że cecha tolerancji polegająca na braku nekroz jest dziedziczona jako pojedynczy recesywny gen *NtTPNI* (*Nicotiana tabacum* Tolerance to PVY-induced Necrosis 1), który jest zlokalizowany na chromosomie 13. Należy podkreślić, że w badaniach Michela i in. (2018) uwzględnione były polskie odmiany: V. 278 i Zamojska 4, będące przedmiotem niniejszej pracy. Termin tolerancja jest definiowany na różne sposoby. Według Singh i Singha (2005) tolerancja jest dziedziczną lub nabytą zdolnością do przetrwania choroby, pozwalającą osiągnąć satysfakcjonujące plony. Również Brandle i in. (1995) definiują tolerancję na wirus PVY^N jako charakteryzującą się słabymi objawami mozaikowymi z obecnością lub bez nekroz nerwów, przy czym rośliny tolerancyjne wzrostem przypominają zdrowe rośliny kontrolne. Do odmian tolerancyjnych zalicza on odmiany Havana 307, Wanda i Wisana, zaś do odmian odpornych VAM, NC744, TN86 i PBD6. Natomiast w przypadku linii hodowlanych tytoniu uprawnego mających odporność od *N. africana* termin tolerancja odnosi się do obecności słabych objawów chorobowych, takich jak chlorotyczne plamy i przejaśnienia nerwów, przy jednoczesnym braku nekroz nerwów u roślin z obecnością wirusa (Doroszewska,

2010; Korbecka-Glinka i in., 2017a). Dlatego autorzy niniejszej pracy w przeciwieństwie do Brandle'a nie zaliczają odmian Havana 307, Wanda i Wisana do grupy obiektów tolerancyjnych, gdyż inokulacja zastosowanymi izolatami spowodowała wystąpienie nekrozy nerwów. Ponadto odmiany te zaliczono do grupy odmian z odpornością typu *va* ze względu na brak amplifikacji markerów podatności.

Drugą podgrupę stanowią odmiany podatne, które posiadają gen podatności *Va*, zaś inokulacja wszystkimi użytymi izolatami wirusa Y ziemniaka powodowała wystąpienie nekroz nerwów.

W odrębnej podgrupie lokalizuje się odmiana Węgierski Ogrodowy, wykazująca specyficzną reakcję na użyte izolaty PVY. Odmiana ta wprawdzie posiada gen podatności *Va*, ale nie wykazała odporności typowej dla tolerancji, tzn. nie uległa porażeniu słabym izolatem. Z kolei izolat bardziej zjadliwy spowodował przejaśnienia nerwów i plamy chlorotyczne, zaś inokulacja izolatami silnymi skutkowałą nekrozami nerwów. Przepuszczalnie odmiana ta posiada inny rodzaj odporności, np. inną, nie wykrytą dotychczas delecję, jak choćby krótka delecja opisywana w pracy Julio i in. (2015).

Wykorzystanie genu *va* jest dość powszechne w hodowli odmian użytkowych (Blancard, 1998). Niniejsze badania pozwoliły ocenić wybrane polskie odmiany i wytypować te, które posiadają ten rodzaj odporności, a także określić jej poziom poprzez ocenę skuteczności w zetknięciu z różnymi izolatami PVY. Jak wykazały badania, nie każda delecja w genie *Va* zabezpiecza przed izolatami PVY występującymi w naszych warunkach polowych. Niestety, wciąż nie posiadamy w obrębie gatunku *N. tabacum* genu warunkującego odporność na wszystkie szczepy PVY. Odmiany posiadające recesywny gen *va* wykazują odporność tylko na część izolatów PVY. Tymczasem międzynarodowe badania Verriera i Doroszewskiej (2018), jak też prowadzone we Francji (Lacroix i in., 2010) i Brazylii (Lacroix i in., 2011) wskazują na wzrost liczebności izolatów nekrotycznych, przełamujących odporność typu *va*. Może to mieć związek z presją środowiska, gdyż występuje duża liczba odmian posiadających tego typu odporność. Z tego powodu ocena odporności odmian z wykorzystaniem różnych izolatów PVY, określenie jej poziomu oraz wskazanie odmian tolerancyjnych ma duże znaczenie praktyczne. Pozwoli również na optymalny dobór komponentów do hodowli odpornościowej

WNIOSKI

1. W obrębie 25 badanych odmian tytoniu w dziewięciu stwierdzono obecność genu podatności *Va*, co zostało wykazane przez amplifikację markerów molekularnych. Natomiast w szesnastu nie wykryto markerów, co wskazuje, że odmiany te posiadają odporność typu *va*.

2. Wśród odmian z odpornością typu *va* stwierdzono zróżnicowany poziom reakcji na infekcję wirusem Y ziemniaka, co może pośrednio świadczyć o różnej długości delekcji w genie podatności. Najwyższą odpornością cechowała się odmiana VAM, która nie uległa porażeniu słabym i średnim izolatami PVY, ale na silne izolaty zareagowała nekrozami nerwów.

3. Pięć odmian wykazało tolerancję wobec wszystkich użytych izolatów PVY – wystąpiły u nich przejaśnienia nerwów i plamy chlorotyczne, ale nie nekrozy. Jednocześnie wykryto w nich gen podatności *Va*, co może wskazywać, że reakcja tolerancji ma inne podłoże genetyczne.

4. Odmiana Węgierski Ogrodowy, mimo obecności genu *Va*, nie uległa porażeniu izolatami słabym, a na izolat średni zareagowała jedynie przejaśnieniami nerwów i plamami chlorotycznymi, natomiast izolaty silne spowodowały nekrozy nerwów. Można przypuszczać, że odmiana ta posiada inny rodzaj odporności niż pozostałe badane odmiany.

PIŚMIENNICTWO

- Acosta-Leal R., Xiong Z., 2008.** Complementary functions of two recessive R-genes determine resistance durability of tobacco 'Virgin A Mutant' (VAM) to *Potato virus Y*. *Virology*, 379: 275-283, doi: 10.1016/j.virol.2008.06.026.
- Ano G., Blancard D., Cailletau B., 1995.** Mise Au point sur la résistance récessive aux souches nécrotiques du virus Y de la pomme de terre (PVY) présente chez *Nicotiana tabacum*. *Ann. du Tabac*, 27: 35-42.
- Blancard D., 1998.** Maladies du Tabac. Observer, Identifier, Lutter. Paris, France: INRA Editions.
- Blancard D., Ano G., Cailletau B., 1994.** Principaux virus affectant le tabac en France. *Ann. Tabac*, 26: 39-51.
- Brandle J. E., Stobbs L. W., Gleddie S., 1995.** Resistance to a necrotic strain of *Potato virus Y* among *Nicotiana* species, somatic hybrids, and tobacco cultivars. *Plant Disease*, 79: 152-154.
- Carstens H., Seehofer F., 1960.** How Virginia SCR is obtained and cultivated in the Federal Republic of Germany. *CORESTA Inf Bull* 3: 39-43.
- Chrzanowska M., 1994.** Differentiation of potato virus Y (PVY) isolates. *Phytopathologia Polonica*, 8: 15-20.
- Doroszevska T., 2004.** Krzyżowanie oddalone i transformacja genetyczna w uzyskiwaniu odporności tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) na wirusa Y ziemniaka. Monografie i Rozprawy Naukowe. Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach.
- Doroszevska 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, doi: 10.1111/j.1439-0523.2009.01634.x.
- Doroszevska T., Berbeć A., 2015.** Metodyka integrowanej ochrony tytoniu. IUNG, Puławy.
- Doroszevska T., Czubačka A., 2008.** Ocena odporności odmian i linii hodowlanych tytoniu na wirusa Y ziemniaka (PVY). *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 13: 29-42.
- Doroszevska T., Depta A., 2011.** Resistance of wild *Nicotiana* species to different PVY isolates. *Phytopathologia* 59: 9-24.
- Doyle J.J., Doyle J.L., 1987.** A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- Drake J. W., 1993.** Rate of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 90: 4171-4175.
- Głazewska Z., 1977.** Odporność dzikich gatunków *Nicotiana* oraz odmian *N. tabacum* i *N. rustica* na nekrotyczne szczepy wirusa Y. *Materiały XVII Sesji Naukowej IOR*: 277-287.
- Gupton C.L., Burk L.G., 1973.** Location of the factor for resistance to potato virus Y in tobacco. *Journal of Heredity*, 64: 289-290, doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a108414.
- Janzac B., Tribodet M., Lacroix C., Moury B., Verrier J. L., Jacquot E., 2014.** Evolutionary pathways to break down the resistance of allelic versions of the PVY resistance gene *va*. *Plant Disease*, 98: 1521-1529, doi: 10.1094/PDIS-11-13-1126-RE.
- Julio E., Cotucheau J., Decorps C., Volpatti R., Sentenac C., Candresse T., Dorlhac de Borne F., 2015.** A Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (eIF4E) is Responsible for the "va" Tobacco Recessive Resistance to Potyvirus. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33: 609-623, doi: 10.1007/s11105-014-0775-4.
- Koelle G., 1961.** Genetische Analyse einer Y-virus (Rippenbraun) resistenten Mutante der Tabaksorte Virgin A. *Der Züchter*, 31: 71-72.
- Korbecka-Glinka G., Czubačka A., Depta A., Doroszevska T., 2017a.** Inheritance of *Potato virus Y* tolerance introgressed from *Nicotiana africana* to cultivated tobacco. *Polish Journal of Agronomy*, 31: 39-44, doi: 10.26114/pja.iung.343.2017.31.06.
- Korbecka-Glinka G., Czubačka A., Przybyś M., Doroszevska T., 2017b.** Resistance vs. Tolerance to *Potato virus Y* In tobacco – comparing effectiveness using virus isolates from Central Europe. *Breeding Science*, 67: 459-465, doi: 10.1270/jsbbs.17019.
- Lacroix C., Glais L., Kerlan C., Verrier J.L., Jacquot E., 2010.** Biological characterization of French *Potato virus Y* (PVY) isolates collected from PVY-susceptible or -resistant tobacco plants possessing the recessive resistance gene *va*. *Plant Pathology*, 59: 1133-1143.
- Lacroix C., Glais L., Verrier -L., Charlier C., Lorencetti C., Jacquot E., 2011.** Impact of tobacco recessive resistance gene *va* on biological properties of Brazilian *Potato virus Y* (PVY) isolates. *Plant Pathology*, 60: 1048-1054, DOI: 10.1111/j.1365-3059.2011.02473.x.
- Le Romancer M., Kerlan C., Nedellec M., 1994.** Biological characterization of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathology*, 43: 138-144, doi: 10.1111/j.1365-3059.1994.tb00563.x.
- Masuta C., Nishimura M., Morishita H., Hataya T., 1999.** A single amino acid change in viral genome-associated protein of *Potato virus Y* correlates with resistance breaking in 'virgin A mutant' tobacco. *Phytopathology*, 89: 118-123, doi: 10.1094/PHYTO.1999.89.2.118.
- Michel V., Julio E., Candresse T., Cotucheau J., Decorps C., Volpatti R., Moury B., Glais L., Dorlhac de Borne F.,**

- Decroocq V., German-Retana S., 2018.** NtTPN: a RPP8-like R gene required for *Potato virus Y*-induced vein necrosis in tobacco. *The Plant Journal*, 95: 700-714, doi: 10.1111/tbj.13980.
- Michel V., Julio E., Candresse T., Cotucheau J., Decorps C., Volpatti R., Moury B., Glais L., Jacquot E., Dorlhac de Borne F., Decroocq V., Gallois J.-L., German-Retana S., 2019.** A complex eIF4E locus impacts the durability of *va* resistance to *Potato virus Y* in tobacco. *Molecular Plant Pathology*, 20(8): 1051-1066, doi: 10.1111/mpp.12810.
- Noguchi S., Tajima T., Yamamoto Y., Ohno T., Kubo T., 1999.** Deletion of large genomic segment in tobacco varieties that are resistant to potato virus Y (PVY). *Molecular and General Genetics*, 262: 822-829.
- Przybyś M., Doroszewska T., Berbeć A., 2013.** Point mutation in the viral genome-linked protein (VPg) of *Potato virus Y* probably correspond with ability to overcome resistance of tobacco. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 11(3&4): 986-989.
- Robaglia C., Caranta C., 2006.** Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science*, 11(1): 40-45.
- Robaglia C., Durand-Tardif M., Tronchet M., Boudazin G., Astier-Manificier S., Casse-Delbart F., 1989.** Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA. *Journal of General Virology*, 70: 35-947, doi: 10.1099/0022-1317-70-4-935.
- Scholthof K. B. G., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G. D., 2011.** Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12(9): 938-954.
- Sierro N., Battey J. N. D., Ouadi S., Bakaher N., Bovet L., Willing A., Geopfert S., Peitsch M. C., Ivanov N. V., 2014.** The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nature Communications*, doi: 10.1038/ncomms4833
- Sievert R. C., 1972.** Sources of resistance to *Potato virus Y* in the genus *Nicotiana*. *Tob. Sci.* 106: 92-94.
- Singh D. P., Singh A., 2005.** Disease and Insect Resistance in Plants. *Sci. Pub.*, USA.
- Takakura Y., Udagawa H., Shinto A., Koga K., 2018.** Mutation of a *Nicotiana tabacum* L. eukaryotic factor gene reduces susceptibility to a resistance-breaking strain of *Potato virus Y*. *Molecular Plant Pathology*, 19(9): 2124-2133, doi: 10.1111/mpp.12686.
- Thole V., Dalmay T., Burgyan J., Balazs E., 1993.** Cloning and sequencing of potato virus Y (Hungarian isolate) genomic RNA. *Gene*, 123: 149-156, doi: 10.1016/0378-1119(93)90118-M.
- Verrier J.L., Doroszewska T., 2004.** The “*va*” resistance to PVY^N in *Nicotiana tabacum*: an assessment of the frequency of “*va*” breaking PVY^N strains based on seven years of field survey on a worldwide basis. In: Proceedings of the 12th European Association for Potato Research (Virology Section) Meeting, 2004, 1319 June 2004, Rennes, France, 86 (Abstract).
- Verrier J.L., Doroszewska T., 2018.** Tobacco Virus Collaborative Study (1996-2011). Virus Disease Sub-Group. Technical Report. CORESTA: <https://www.coresta.org/tobacco-virus-collaborative-study-1996-2011-31554.html>.
- Wittmann S., Chatel H., Fortin M.G., Laliberte J.F., 1997.** Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology*, 234: 84-92, doi: 10.1006/viro.1997.8634.
- Yamamoto Y., 1992.** Studies on breeding of tobacco varieties resistant to vein necrosis disease by potato virus Y strain T. *Bull Leaf Tobacco Research Laboratory*, 2: 1-85.

A. Depta, T. Doroszewska, A. Czubačka

DIVERSIFICATION OF RESISTANCE RESPONSE OF SELECTED TOBACCO CULTIVARS (*NICOTIANA TABACUM*) DEPENDING ON THE USED *POTATO VIRUS Y* ISOLATES

Summary

Potato virus Y (PVY) causes tobacco vein necrosis. It belongs to the group of ten most dangerous plant viruses responsible for large economic losses. Within the species *Nicotiana tabacum*, the resistance to this virus is conditioned by the single recessive *va* gene resulting from a deletion in the susceptibility *Va* gene. Many tobacco cultivars have this resistance, including VAM, Wiślica and Virginia SCR (V. SCR). However, their resistance is overcome by the virulent PVY isolates, so it is necessary to search for new sources of resistance or combine ones already known.

The aim of the study was to identify cultivars with *va* resistance, and to assess its effectiveness depending on the used PVY isolate. Research also included the search for new resistance factors within *Nicotiana tabacum* cultivars. Twenty five tobacco cultivars were tested for resistance to PVY in biological tests by artificial inoculation under greenhouse conditions. Four virus isolates with different levels of virulence were used for the studies. After four weeks, disease symptoms were observed, and DAS-ELISA tests were performed using specific antibodies to confirm the presence of the virus in plants. The tested cultivars showed a different degree of PVY susceptibility depending on the used isolate.

The identification of the *va* gene was carried out by using PCR for amplification of two markers of the length 146 and 402 bp. The presence of amplicons indicated the presence of *Va* susceptibility gene, while cultivars with the *va* resistance gene did not amplify the products. The highest resistance was characteristic of cv. VAM which was not infected with isolates IUNG 23 and IUNG 17, defined as weak and medium, although the remaining isolates, described as strong (IUNG 22 and IUNG20), caused vein necrosis and the presence of the virus was confirmed in plant tissues by a positive DAS-ELISA test result. Six cultivars that did not show disease symptoms only after applying the weak isolate, had a slightly lower resistance. Other cultivars with *va* resistance were infected by all used PVY isolates. Another five cultivars, after infection with four isolates, showed symptoms of tolerance, i.e. vein clearing and chlorotic spots of a leaf blade, but they did not have vein necrosis, in spite of that molecular tests confirmed the presence of *Va* susceptibility gene. Moreover, interesting results were noted for cv. Węgierski Ogrodowy, that, despite the presence of the susceptibility gene, was not infected by weak iso-

late IUNG23. The last group included susceptible cultivars that reacted with vein necrosis to all used PVY isolates.

Since virulent PVY isolates are able to break *va* resistance, the knowledge of the nature and stability of the resistance of cultivars is particularly important, especially within Polish cultivars.

In addition, the rising number of necrotic isolates in Poland and in the world, capable of breaking existing sources of resistance, can cause an increased use of tolerant cultivars in tobacco breeding.

Keywords: PVY isolates, *va* gene, tolerance

Opracowano w ramach realizacji zadania 1.2 PW IHAR-PIB pt. Gromadzenie i zachowanie w kolekcjach polowych, in vitro i kriokonserwacja, charakterystyka, ocena, dokumentacja i udostępnianie zasobów genetycznych i informacji w zakresie roślin rolniczych oraz innych roślin użytkowych, spokrewnionych dzikich gatunków i roślin towarzyszących.

Autor	ORCID
Anna Depta	0000-0001-7578-5197
Teresa Doroszevska	0000-0002-2362-7119
Anna Czubacka	0000-0003-1843-6745

data zarejestrowania pracy w redakcji Polish Journal of Agronomy: 17 czerwca 2020 r.

data uzyskania recenzji: 10 lipca 2020 r.

data akceptacji: 18 sierpnia 2020 r.



This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-ShareAlike (CC BY-SA) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).