

Zróźnicowanie reakcji odpornościowej na wirus Y ziemniaka wśród alloplazmatycznych form tytoniu

Anna Czubacka, Anna Depta, Teresa Doroszevska

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

Abstrakt. Cytoplazmatyczna męska sterylność (cms) jest wykorzystywana w hodowli roślin w celu otrzymania form niezdolnych do samozapylenia, które wykorzystuje się głównie w hodowli odmian mieszańcowych F_1 . Cytoplazmatycznie męskosterylne rośliny otrzymuje się w wyniku mutacji w genomie cytoplazmatycznym przez podstawienie w miejsce natywnej cytoplazmy innej cytoplazmy pochodzącej z odmiennego gatunku lub krzyżowanie w obrębie gatunku. U podstaw cms leży niezgodność pomiędzy genomem jądra komórkowego i cytoplazmą. Alloplazmatyczne formy wykształcają zmodyfikowane, niefunkcjonalne męskie organy generatywne lub nie wykształcają ich wcale. Przy tym zmiany morfologiczne mogą obejmować także inne części kwiatu, a niekiedy całą roślinę. Obecność obcej cytoplazmy może wpływać też na inne cechy, w tym na odporność roślin na patogeny. Aby określić wpływ obcej cytoplazmy na odporność tytoniu na wirus Y ziemniaka (PVY), wykonano sztuczne inokulacje tytoniu dwoma izolatami PVY o różnej wirulencji. Testom poddano 13 izogenicznych form cytoplazmatycznie męskosterylnych odmiany Zamojska 4 z cytoplazmą pochodzącą od dzikich gatunków z rodzaju *Nicotiana*, a także formę z cytoplazmą cms mutantą otrzymanego w obrębie gatunku *N. tabacum*. Odporność roślin oceniano na podstawie objawów chorobowych oraz wyników testu immunoenzymatycznego DAS-ELISA. Zaobserwowano różnice zarówno w nasileniu objawów chorobowych, jak i w terminie ich wystąpienia od momentu zakażenia roślin. Zróźnicowanie badanych form alloplazmatycznych pod względem odpowiedzi na infekcję wirusową pozwala przypuszczać, że mechanizmy odporności na PVY mogą być związane z określoną formą cytoplazmy.

słowa kluczowe: cytoplazmatyczna męska sterylność, forma alloplazmatyczna, *Potato virus Y*, tytoń, *Nicotiana*

WSTĘP

W hodowli roślin uprawnych wykorzystywane jest zjawisko cytoplazmatycznej męskiej sterylności (cms), które

pozwała na otrzymanie form niezdolnych do samozapylenia. Ułatwia to hodowcy prowadzenie kontrolowanej produkcji mieszańców z przeznaczeniem na cele komercyjne bez konieczności pracochłonnego ręcznego usuwania pylników (Majewska-Sawka, Sadoch, 2003; Doroszevska i in., 2009). Ponadto dystrybucja form cms umożliwiła ochronę praw autorskich hodowcy, ponieważ zapobiega nieautoryzowanej reprodukcji nasion (Doroszevska i in., 2009), jako że formy cms mogą zawiązać nasiona jedynie w wyniku zapylenia pyłkiem uzyskanym z formy dopełniającej (np. odmiany wyjściowej).

Cytoplazmatyczna męska jałowość jest wynikiem mutacji w genomie cytoplazmatycznym lub powstaje na skutek zastąpienia natywnej cytoplazmy cytoplazmą pochodzącą z innego gatunku (Carlsson, Glimelius, 2011). Przyczyną utraty płodności jest niezgodność pomiędzy genomem jądrowym i cytoplazmatycznym. U podłoża cytoplazmatycznej męskiej sterylności leży szereg procesów, w których wyniku dochodzi do zaburzeń mikrosporogenezy i w efekcie do produkcji niefunkcjonalnych mikrospor lub ziaren pyłku (Majewska-Sawka, Sadoch, 2003). Cytoplazmatyczna męska sterylność jest dziedziczona po formie matecznej. U form alloplazmatycznych tytoniu obserwuje się brak organów generatywnych męskich lub ich degenerację (Doroszevska i in., 2009).

Liczne formy alloplazmatyczne tytoniu uprawnego (*Nicotiana tabacum* L.) zgromadzone są w kolekcji rodzaju *Nicotiana* prowadzonej w IUNG-PIB w Puławach. Wiele z nich uzyskano na bazie odmiany Zamojska 4 przez podstawienie cytoplazmy różnych gatunków dzikich należących do rodzaju *Nicotiana*. Alloplazmatyczne formy tytoniu posiadające cytoplazmę z gatunków *Nicotiana bigelovii*, *N. goodspeedii* i *N. suaveolens* trafiły do puławskiej kolekcji z Zimbabwe z ośrodka naukowego w Harare, a z cytoplazmą podstawioną od *N. glutinosa*, *N. megalosiphon*, *N. occidentalis*, *N. plumbaginifolia* i *N. undulata* otrzymano z placówki naukowej mieszczącej się w rosyjskim Krasnodarze. W puławskim instytucie przez krzyżowanie wsteczne wymienionych form alloplazmatycznych

Autor do kontaktu:

Anna Czubacka

e-mail: annacz@iung.pulawy.pl

phone: +48 81 4786 933

z odmianą Zamojska 4 uzyskano cytoplazmatycznie męskosterylne linie izogeniczne. Pozostałe formy alloplazmatyczne cms odmiany Zamojska 4 zostały utworzone od podstaw przez naukowców z IUNG w Puławach, którzy wykorzystali do tego celu gatunki: *N. amplexicaulis*, *N. debneyi*, *N. eastii*, *N. exigua*, *N. glauca*, *N. knightiana*, *N. raimondii* oraz mutantą *N. tabacum* (Berbeć, 2001; Doroszewska i in., 2009). Jedynie sposób powstania formy *N. tabacum* cms *eastii* nie jest do końca jasny. Roślina cytoplazmatycznie męskosterylna została odnaleziona wśród potomstwa F₁ pochodzącego z krzyżowania *N. eastii* × *N. tabacum*. Prawdopodobnie powstała na drodze androgenezы komórki plemnikowej *N. tabacum* w woreczku zalążkowym *N. eastii* (Berbeć, Berbeć, 1992; Berbeć, 2001). Pozostałe formy cms tytoniu otrzymano przez tradycyjne krzyżowanie międzygatunkowe (Berbeć, 2001). Przykładowo forma Zamojska 4 cms *amplexicaulis* została uzyskana przez zapylenie *N. amplexicaulis* pyłkiem *N. tabacum* odm. Zamojska 4, a po podwojeniu liczby chromosomów mieszańiec był jeszcze kilkakrotnie krzyżowany wstecznie z tą odmianą. Natomiast linię Zamojska 4 cms *knightiana* otrzymano w wyniku krzyżowania tetraploidalnych form *N. knightiana* i *N. tabacum*, a następnie formę mieszańcową wielokrotnie krzyżowano przez zapylenie pyłkiem odmiany Zamojska 4 (Berbeć, Doroszewska, 1992). Według podobnego schematu wyprowadzono formę Zamojska 4 z cytoplazmą *N. raimondii*. Tymczasem męska sterility warunkowana cytoplazmą *N. tabacum* została odkryta jako spontaniczna mutacja, która wystąpiła w uprawie polowej tytoniu i okazała się trwała (Berbeć, 1994; Berbeć, 2001).

W zależności od pochodzenia cytoplazmy formy cms wykazują różnorodne zmiany morfologiczne głównie w budowie kwiatów i organów generatywnych. Jednakże mogą dotyczyć one także pokroju rośliny, który niekiedy w znacznym stopniu odbiega od odmiany Zamojska 4, jak ma to miejsce w przypadku form z cytoplazmą gatunków *N. goodspeedii* i *N. megalosiphon* (Berbeć, 2001; Doroszewska i in., 2009).

Poza wpływem na cechy morfologiczne roślin, obca cytoplazma może również zmieniać odporność na choroby w porównaniu do odmiany wyjściowej (Doroszewska i in., 2009). Formy Zamojska 4 z cytoplazmą podstawioną z gatunków *N. eastii* i *N. plumbaginifolia* uległy silnemu porażeniu mączniakiem rzekomym w warunkach polowych w sezonie charakteryzującym się dużym nasileniem wystąpienia patogena, podczas gdy pozostałe formy cms wykazały tolerancję (Berbeć, 2001). Rodzaj cytoplazmy różnicował także wystąpienie objawów brunatnej nekrozy nerwów i cerkosporiozy na męskosterylnych formach odmiany Wiślica w warunkach naturalnej presji patogenów wywołujących te choroby (Berbeć, Laskowska, 2005).

Odmiana Zamojska 4 wykazuje pewien stopień odporności na wirus Y ziemniaka (PVY, *Potato virus Y*), co chroni rośliny przed rozwojem pełnych objawów chorobowych, tj. nekrozy nerwów, nawet przy infekcji powodowanej przez

silne izolaty PVY (np. z grupy PVY^{NTN}) mające zdolność do przełamania odporności większości współczesnych odmian uprawnych warunkowanej genem *va*. Z drugiej strony przy porażeniu nawet łagodnymi izolatami (np. z grupy PVY^{NW}) odm. Zamojska 4 nie wykazuje pełnej odporności, ale reaguje przejaśnieniami nerwów bądź plamami chlorotycznymi, co wskazuje na jej tolerancję wobec wirusa. Cecha ta jest warunkowana mutacjami w obrębie genu *NtTPNI* występującego na 13. chromosomie genomu tytoniu, podczas gdy jego forma niezmutowana odpowiada za występowanie nekrozy nerwów będących następstwem infekcji powodowanej przez nekrotyczne izolaty PVY (Micheli i in., 2018).

Dotychczas w licznych publikacjach opisano otrzymywanie form cytoplazmatycznie męskosterylnych odmiany Zamojska 4 oraz scharakteryzowano je pod względem morfologicznym i użytkowym, ale nie badano ich odporności na choroby. Celem niniejszej pracy było określenie jak obca cytoplazma wpływa na odporność form cytoplazmatycznie męskosterylnych odmiany Zamojska 4 na wirus Y ziemniaka.

MATERIAŁY I METODY

Materiał roślinny

Materiał do badań stanowiły formy cytoplazmatycznie męskosterylne tytoniu szlachetnego (*Nicotiana tabacum* L.). Badaniom poddano 13 alloplazmatycznych form odmiany Zamojska 4 z cytoplazmą pochodzącą od gatunków: *Nicotiana amplexicaulis*, *N. debneyi*, *N. eastii*, *N. exigua*, *N. glauca*, *N. glutinosa*, *N. goodspeedii*, *N. knightiana*, *N. megalosiphon*, *N. occidentalis*, *N. suaveolens*, *N. raimondii* (forma Zamojska 4 cms *rai-2*), *N. undulata*, a także formę cms z cytoplazmą od mutantą otrzymanego w obrębie gatunku *Nicotiana tabacum*. Kontrolę stanowiły podatna na PVY odmiana Samsun H oraz odporna odmiana Wiślica wykazująca podatność tylko wobec silnych izolatów wirusa zdolnych do przełamania odporności typu *va*.

Test inokulacji

W badaniach odpornościowych wykorzystano dwa izolaty wirusa Y ziemniaka różniące się wirulencją. Izolat IUNG20 pochodzi z odmiany odpornej i przełamuje odporność typu *va* występującą w odmianie Wiślica, natomiast izolat IUNG21 pozyskany z odmiany podatnej, nie poraża odmiany Wiślica. Izolat IUNG20 jest wykrywany za pomocą przeciwciał MoAbs antiY IgG (Bioreba) rozpoznających wszystkie izolaty PVY, jak i przeciwciał monoklonalnych MoAbs antiY^N IgG (Bioreba) wykrywających białko płaszczki wyłącznie nekrotycznych izolatów PVY. Natomiast izolat IUNG21 jest wykrywany tylko pierwszymi wspomnianymi przeciwciałami MoAbs antiY IgG (Bioreba).

Doświadczenie wykonano w fitotronie w warunkach kontrolowanych, zapewniając fotoperiod 16/8 godzin

(dzień/noc) oraz temperaturę 24°C w dzień i 18°C w nocy. Nasiona wysiano, a następnie rośliny rozsadzono do pojedynczych doniczek w komercyjne podłoże torfowe. Zakażanie wirusem Y ziemniaka prowadzono w fazie 5–6 liści. Izolaty PVY zostały wcześniej namnożone na roślinach tytoniu podatnej odmiany Samsun H odpornej na TMV, co zabezpieczyło przed niepożądaną infekcją tym wirusem. Z roślin odmiany Samsun H pobierano liście, ucierano w moździerz i wyciskano sok, którym zakażano testowane rośliny poprzez pocieranie liści uprzednio posypanych karborundem. W obrębie poszczególnych badanych obiektów (forma cms lub odmiana płodna) zakażano po 10 roślin każdym z dwóch izolatów wirusa. Zakażone rośliny chroniono przed bezpośrednim wpływem światła słonecznego przez 48 godzin. Po dwóch tygodniach wykonano pierwsze obserwacje objawów chorobowych, a po czterech tygodniach wykonano test immunoenzymatyczny DAS-ELISA z przeciwciałami monoklonalnymi MoAbs antiY IgG (Bioreba, nr katalogowy IgG112911). Wynik testu uznano za pozytywny, gdy wartość absorbancji przy długości fali 405 nm była wyższa o co najmniej 0,2 od kontroli negatywnej. Za odporne uznano rośliny bez objawów chorobowych, w których tkankach nie wykryto obecności wirusa.

WYNIKI

Inokulacja odmiany Zamojska 4 izolatami IUNG21 spowodowała wystąpienie przejaśnień nerwów liści, a objawy określono jako wczesne, ponieważ obserwowane były już po dwóch tygodniach od zakażenia. Zastosowanie izolatu silniejszego – IUNG20 również spowodowało szybką reakcję odmiany Zamojska 4, przy czym obok przejaśnień nerwów na liściach wystąpiły także chlorotyczne przebarwienia blaszki liściowej (tab. 1, fot. 1). Żaden z użytych izolatów nie wywołał nekrozy nerwów liści odmiany Zamojska 4, podczas gdy silny izolat IUNG20 spowodował nekrozę nerwów liści kontrolnej odmiany Wiślica (fot. 2).

Na męskosterylnych formach alloplazmatycznych Zamojska 4 z cytoplazmą pochodzącą od gatunków *N.amplexicaulis*, *N. debneyi*, *N. eastii*, *N. exigua*, *N. glutinosa* i *N. undulata* po inokulacji izolatami IUNG21 objawy chorobowe pojawiły się wcześniej, tj. już po dwóch tygodniach od sztucznej inokulacji, przybierając postać przejaśnień nerwów liści. Jedynie na formie cms Zamojska 4 z cytoplazmą *N. tabacum* wyraźne przejaśnienia nerwów rozwinęły się dopiero po 4 tygodniach od zakażenia. Natomiast na roślinach form cms z cytoplazmą podstawioną z gatunków *N. glauca*, *N. goodspeedii*, *N. knightiana*, *N. megalosiphon*, *N. occidentalis*, *N. raimondii* i *N. suaveolens* symptomy chorobowe objęły także blaszkę liściową, na której wystąpiły chlorotyczne przebarwienia.

Tymczasem inokulacja silniejszym izolatami – IUNG20 skutkowała nekrozami bocznych nerwów liści na alloplazmatycznych formach cms z cytoplazmą pochodzącą z *N. eastii*, *N. occidentalis* (fot. 3), *N. suaveolens* i *N. tabacum*



Fotografia 1. Objawy tolerancji (przejaśnienia nerwów i plamy chlorotyczne) na płodnej odmianie tytoniu Zamojska 4 po inokulacji izolatami PVY IUNG20

Photography 1. Symptoms of tolerance (vein clearing and chlorotic spots) on tobacco of fertile cv. Zamojska 4 after inoculation with PVY IUNG20.



Fotografia 2. Silne objawy porażenia (nekrozy nerwów) spowodowane infekcją izolatami PVY IUNG20 na tytoniu odmiany Wiślica użytej jako kontrola

Photography 2. Severe symptoms (vein necrosis) on tobacco of control cv. Wiślica caused by isolate PVY IUNG20.

(fot. 4). Silnym objawom towarzyszyły chlorotyczne plamy na blaszce liściowej oraz przejaśnienia nerwów nieobjętych nekrozami. Natomiast najłagodniejszymi objawami zareagowały formy posiadające cytoplazmę od *N. goodspeedii*, *N. megalosiphon* oraz *N. undulata*, na których obserwowano wystąpienie tylko chlorotycznych przebarwień blaszki liściowej. W dodatku symptomy chorobowe rozwinęły się stosunkowo późno. Oznacza to, że te formy

Tabela 1. Wpływ obecnej cytoplazmy na reakcję odpornościową form alloplazmatycznych odmiany Zamojska 4 na PVY
 Table 1. The influence of alien cytoplasm to the resistance response of cultivar Zamojska 4 to PVY.

Odmiana Cultivar	Wyniki testu odporności po inokulacji izolatami: Results of resistance test after inoculation with isolate:					
	IUNG20		IUNG21			
	wynik testu DAS-ELISA DAS-ELISA test result [#]	liczba roślin z VN/badanych number of plants with VN/tested	inne objawy other symptoms [#]	wynik testu DAS-ELISA DAS-ELISA test result [#]	liczba roślin z VN/badanych number of plants with VN/tested	inne objawy other symptoms [#]
Zamojska 4						
<i>cms amplexicaulis</i>	+	0/10	VC, CS wczesne; early	+	0/10	VC wczesne; early
<i>cms debneyi</i>	+	0/10	VC, CS wczesne; early	+	0/10	VC wczesne; early
<i>cms eastii</i>	+	1/10	VC, CS wczesne; early	+	0/10	VC wczesne; early
<i>cms exigua</i>	+	0/10	VC, CS wczesne; early	+	0/10	VC wczesne; early
<i>cms glauca</i>	+	0/10	VC, CS wczesne; early	+	0/10	VC, CS wczesne; early
<i>cms glutinosa</i>	+	0/10	VC, CS wczesne; early	+	0/10	VC wczesne; early
<i>cms goodspeedii</i>	+	0/10	CS późne; late	+	0/10	VC, CS wczesne; early
<i>cms knightiana</i>	+	0/10	VC, CS wczesne; early	+	0/10	VC, CS wczesne; early
<i>cms megalosiphon</i>	+	0/10	CS późne; late	+	0/10	VC, CS wczesne; early
<i>cms occidentalis</i>	+	1/10	VC, CS wczesne; early	+	0/10	VC, CS wczesne; early
<i>cms raimondii (rat-2)</i>	+	0/10	VC, CS wczesne; early	+	0/10	VC, CS wczesne; early
<i>cms suaveolens</i>	+	2/10	VC, CS wczesne; early	+	0/10	VC, CS wczesne; early
<i>cms tabacum</i>	+	1/10	VC, CS wczesne; early	+	0/10	VC późne; late
<i>cms undulata</i>	+	0/10	CS późne; late	+	0/10	VC wczesne; early
Zamojska 4 (plodna; fertile)	+	0/10	VC, CS wczesne; early	+	0/10	VC wczesne; early
Wiślica (kontrola; control)	+	10/10	VC wczesne; early	-	0/10	NS
Samsun H (kontrola; control)	+	10/10	VC wczesne; early	+	10/10	VN wczesne; early

Objawy: VN – nekrozy nerwów, VC – przejaśnienia nerwów, CS – chlorotyczne plamy, NS – bez objawów

Symptoms: VN – vein necrosis, VC – vein clearing, CS – chlorotic spots, NS – no symptoms.

Wynik testu ELISA: (+) pozytywny, (-) negatywny; [#] dotyczy wszystkich badanych roślin

DAS-ELISA test results: (+) positive, (-) negative; [#] concerns all tested plants.



Fotografia 3. Objawy porażenia izolatem PVY IUNG20 (nekrozy nerwów i chlorotyczne plamy na blaszce liściowej) na tytoniu formy Zamojska 4 cms *occidentalis*

Photography 3. Symptoms after inoculation with PVY isolate IUNG20 (vein necrosis and chlorotic spots of leaf blade) on tobacco of Zamojska 4 cms *occidentalis* form.



Fotografia 4. Łagodne objawy (chlorotyczne plamy) po inokulacji tytoniu formy Zamojska 4 cms *tabacum* izolatem PVY IUNG20

Photography 4. Mild symptoms (chlorotic spots) after inoculation of tobacco Zamojska 4 cms *tabacum* form with isolate PVY IUNG20.

alloplazmatyczne odmiany Zamojska 4 wykazały nieco wyższą tolerancję na izolat IUNG20 od odmiany wyjściowej.

Testy serologiczne potwierdziły obecność wirusa w tkankach roślin należących zarówno do odmiany Zamojska 4, jak i jej form alloplazmatycznych, a także podatnej odmiany kontrolnej Samsun H niezależnie od rodzaju użytego izolatu PVY. Wirus został wykryty również w roślinach należących do odmiany Wiślica zakażanych izolatem przełamującym ich odporność – IUNG20. Negatywny

wynik testu DAS-ELISA odnotowano tylko w przypadku roślin odmiany Wiślica zakażanych słabszym izolatem – IUNG21, co jednocześnie pozwoliło na potwierdzenie charakteru tego izolatu jako niezdolnego do przełamania odporności typu *va*.

DYSKUSJA

Odmiana Zamojska 4 uznawana jest za tolerancyjną wobec infekcji wirusem Y ziemniaka, ponieważ nigdy nie obserwowano na niej nekrozy nerwów. Nawet w przypadku użycia silnego izolatu wirusa, który poraża odmianę Wiślica, wywołując na niej nekrozy nerwów, odmiana Zamojska 4 reaguje jedynie łagodnymi symptomami – chlorotycznymi przejaśnieniami blaszki liściowej i nerwów (Doroszevska, dane niepublikowane).

Według Michela i in. (2018) w odmianach tytoniu podatnych na PVY białko będące produktem genu *NtTPNI* oddziałuje z wirusowym białkiem HcPro, co prowadzi do nekroz nerwów. Niezmodyfikowane białko NtTPNI jest porównywane do białek R odpowiedzialnych za powstawanie odpowiedzi nadwrażliwości, a wystąpienie nekroz jest określane jako próba (wprawdzie nieskuteczna) ograniczenia infekcji wirusowej. Natomiast w odmianach tolerancyjnych, w tym w odmianie Zamojska 4, w jądrowym genie *NtTPNI* wykryto cztery niezależnie występujące mutacje punktowe prowadzące do podstawienia aminokwasów i w efekcie do produkcji zmienionego białka niezdolnego do interakcji z białkiem wirusa. Dzięki temu rośliny będące homozygotami nie reagowały nekrozami nerwów nawet po inokulacji silnymi izolatami PVY (przełamującymi odporność typu *va*), a jedynie obserwowano wystąpienie zmian mozaikowych.

Tymczasem, jak wskazują badania własne, zastąpienie natywnej cytoplazmy inną – pochodzącą z dzikiego gatunku z rodzaju *Nicotiana*, w wielu przypadkach doprowadziło do zmiany w reakcji na porażenie wirusem. Alloplazmatyczne formy cytoplazmatycznie męskosterylne odmiany Zamojska 4, do których przeniesiono cytoplazmę z gatunków *N. goodspeedii*, *N. megalosiphon*, *N. undulata*, nie tylko zareagowały objawami łagodniejszymi niż ich płodny odpowiednik, ale też objawy te wystąpiły z opóźnieniem.

Podatność form alloplazmatycznych cytoplazmatycznie męskosterylnych tytoniu była analizowana również przez Berbecia i Laskowską (2005), przy czym obce cytoplazmy zostały połączone z jądrowym genomem odmiany Wiślica. Prowadzone obserwacje dotyczyły roślin porażonych drogą naturalną w warunkach polowych, bez serologicznej identyfikacji wirusa, co oznacza, że jego wirulencja nie była możliwa do określenia. Porażeniu jednak uległo niespełna 1% roślin w obrębie płodnej odmiany Wiślica. W przypadku użycia cytoplazmy z gatunków *N. goodspeedii*, *N. megalosiphon* i *N. undulata*, formy alloplazmatyczne odmiany Wiślica wykazały chlorotyczne zmiany na

blaszce liściowej na około 1% roślin. Według Doroszewskiej i Depty (2011) gatunki będące dawcami cytoplazmy (*N. goodspeedii*, *N. megalosiphon*, *N. undulata*), na sztuczną inokulację różnymi izolatami PVY odpowiadały objawami obejmującymi zarówno chlorotyczne plamy na liściach, jak i deformacje i zmiany mozaikowe. Jednak inne gatunki, których cytoplazma posłużyła do utworzenia pozostałych form cms testowanych w prezentowanych badaniach, w większości nie wykazywały nekrotycznych objawów nawet po inokulacji silnymi izolatami. Nekrozy po inokulacji izolatami PVY były obserwowane na gatunkach *N. occidentalis* i *N. suaveolens* (Doroszevska, Depta, 2011).

Nieliczne osobniki w obrębie form Zamojska 4 cms *eastii*, Zamojska 4 cms *occidentalis* i Zamojska 4 cms *suaveolens* po inokulacji izolatami IUNG20 również reagowały nekrozami nerwów, co oznacza, że izolat zdołał przełamać tolerancję tych form. Podobnie linia hodowlana BPA wykazująca tolerancję wobec wszystkich używanych do inokulacji izolatów PVY (Doroszevska, 2010; Korbecka-Glinka i in., 2017), po podstawieniu cytoplazmy *N. suaveolens*, zareagowała nekrozą nerwów pojedynczych roślin w zetknięciu z wirulentnymi izolatami PVY w warunkach polowych (Doroszevska, doniesienie ustne). Wśród form cms uzyskanych na bazie odmiany Wiślica z użyciem cytoplazmy z *N. occidentalis* i *N. suaveolens* także odnotowano kilkuprocentowy udział roślin porażonych, w tym tych z nekrozami (Berbeć, Laskowska, 2005). Nekrozy były też obserwowane na alloplazmatycznych formach odmiany Wiślica z cytoplazmą *N. amplexicaulis*, *N. exigua*, *N. glauca* i *N. knightiana*, podczas gdy w badaniach własnych na formach odmiany Zamojska 4 z tymi typami cytoplazmy występowały tylko przejaśnienia nerwów i chlorotyczne plamy blaszki liściowej, co potwierdza, że rozwój pełnych objawów jest warunkowany przez czynniki genetyczne występujące w jądrze komórkowym.

Z kolei forma Zamojska 4 z cytoplazmą od *N. glutinosa* nie wykazała nekroz nerwów, mimo że gatunek będący dawcą cytoplazmy – *N. glutinosa* reagował nekrozami na zakażenie silnymi izolatami PVY (Doroszevska, Depta, 2011). Natomiast alloplazmatyczna forma odmiany Wiślica w warunkach infekcji polowej pozostawała zdrowa (Berbeć, Laskowska, 2005). Gatunki *N. raimondii* i *N. glauca* nie miały objawów chorobowych po zakażeniu sześcioma izolatami PVY (Doroszevska, Depta, 2011). Tymczasem testowane formy cms posiadające pochodzące z nich cytoplazmy wykazywały objawy charakterystyczne dla odmiany Zamojska 4. Analogiczne formy cms utworzone na bazie odmiany Wiślica w warunkach polowych też uległy porażeniu, choć w niewielkim procencie (Berbeć, Laskowska, 2005). Z kolei obecność cytoplazmy pochodzącej od mutanta *N. tabacum* spowodowała, że na większości osobników należących do formy cytoplazmatycznie męskosterylnej odmiany Zamojska 4 obserwowano łagodne objawy, ale na jednej roślinie wystąpiły nekrozy nerwów. Za-

każenie tej formy słabszym izolatami IUNG21 skutkowało pojawieniem się tylko przejaśnień nerwów i to w dodatku stosunkowo późno w porównaniu z innymi formami cms.

Zmiany w odporności form cytoplazmatycznie męskosterylnych w stosunku do ich płodnych odpowiedników wskazują na rolę w kształtowaniu odporności nie tylko czynników jądrowych, ale również cytoplazmatycznych i powodowane są prawdopodobnie zakłóceniami w komunikacji pomiędzy jądrem komórkowym a obcą cytoplazmą. Niezgodność może wystąpić na różnych poziomach funkcjonowania komórki. Zakłócenia mogą dotyczyć szeregu procesów metabolicznych lub lokalizacji czynników pełniących rolę w odpowiedzi odpornościowej rośliny. Przyjmując wspomniany wcześniej model tolerancji zaproponowany przez Michela i in. (2018), w odmianie Zamojska 4 zmodyfikowane białko NtTPN1 nie jest rozpoznawane przez wirusa, przez co nie dochodzi do powstania nadwrażliwości w postaci nekroz nerwów. Jednak czynniki zawarte w obcej cytoplazmie mogą zmieniać sposób oddziaływania między tym białkiem a wirusowym HcPro, prowadząc do przywrócenia reakcji nadwrażliwości.

Odporność typu *va* występująca w odmianie Wiślica, użytej przez nas jako kontrola, podobnie jak w odmianie Zamojska 4, jest warunkowana mutacją w genie podatności i ma charakter recesywny. Mutacja ta polega na delecji w obrębie genu jądrowego *Va* i prowadzi do produkcji zmodyfikowanego białka eIF4E będącego czynnikiem translacyjnym (Julio i in., 2015). Tymczasem wymienione białko eIF4E wchodzi w interakcję z białkiem VPg będącym jednym z produktów translacji RNA wirusa Y ziemniaka, co prowadzi do replikacji genomu wirusowego i jego translacji, w efekcie przyczyniając się do rozwoju infekcji (Tiziana, Gallitelli, 2014). Co ciekawe, obecność mRNA będącego transkryptem genu *eIF4E* stwierdzono w chloroplastach różnych gatunków roślin, w tym tytoniu. Wiadomo jednak, że do produkcji białka eIF4E w tych organellach nie dochodzi, więc przypuszcza się, że w chloroplastach transkrypt jest jedynie przechowywany, co ma służyć regulacji jego poziomu w cytozolu (Nicolaï i in., 2007). Może to wskazywać na rolę czynników cytoplazmatycznych w rozwoju infekcji powodowanej przez PVY i tłumaczyć różnice w poziomie tolerancji form alloplazmatycznych. Przypuszcza się też, że chloroplasty mają wpływ na działanie plasmodesm stanowiących połączenia pomiędzy cytoplazmami sąsiadujących komórek i mających znaczenie w rozwoju odporności systemicznej (Fernandez, Burch-Smith, 2019).

W odporności komórki roślinnej istotną rolę odgrywają także mitochondria, których funkcjonowanie w wyniku stresu biotycznego, np. infekcji wirusowej, zostaje zakłócone, co generuje zmiany w procesie oddychania i skutkuje produkcją wolnych rodników tlenowych, za których pośrednictwem mitochondria regulują ekspresję genów jądrowych (Chamandoosti, 2017; Czarnocka, Karpiński, 2018; Cvetkova i in., 2013). Ponadto powstawanie wol-

ných rodników prowadzi do odpowiedzi typu nadwraźliwości, za którą może zostać uznane tworzenie nekroz jako próba ograniczenia rozprzestrzeniania się wirusa w tkankach rośliny. Podwyższony poziom wolnych rodników wystąpił bowiem w podatnej odmianie tytoniu po inokulacji izolatem PVY^N, a w tkankach roślin tolerancyjnych, w tym odmiany Zamojska 4, nie stwierdzono akumulacji tych reaktywnych form tlenu (Michel i in., 2018).

A zatem budowa i funkcjonowanie poszczególnych organelli oraz jakość współpracy pomiędzy nimi ma istotny wpływ na wiele procesów zachodzących w komórce i w roślinie, w tym na procesy związane z odpowiedzią na infekcję.

Dlatego połączenie jądra komórkowego z cytoplazmą pochodzącą od innego gatunku może przyczynić się do podwyższenia lub obniżenia poziomu odporności roślin. Takie zróźnicowanie reakcji odpornościowej zaobserwowano w przypadku połączenia jądra komórkowego z odmiany uprawnej Zamojska 4 i cytoplazmy z *N. goodspeedii*, *N. megalosiphon* i *N. undulata*, gdzie alloplazmatyczne formy cms wprawdzie nie były całkowicie odporne, ale tolerancja roślin na izolat IUNG20 wzrosła w stosunku do odmiany wyjściowej, a obserwowane symptomy były opóźnione. Przeciwnie, tolerancja alloplazmatycznych form cms z cytoplazmą pochodzącą od gatunków *N. eastii*, *N. occidentalis* i *N. suaveolens* została przełamana, prowadząc do pełnych objawów chorobowych. Odmienne od pozostałych form cms zachowała się forma z cytoplazmą mutantu *N. tabacum*, gdzie w wyniku inokulacji izolatem IUNG20 doszło do przełamania odporności, ale izolat IUNG21 spowodował objawy opóźnione, a przy tym stosunkowo łagodne. Różnice w reakcji badanych form alloplazmatycznych na infekcję wirusową wskazują, że mechanizmy tolerancji w poszczególnych formach są odmienne i zależą od rodzaju zastosowanej cytoplazmy.

Należy jednak podkreślić, że obniżenie reakcji odpornościowej na PVY spowodowane wpływem obcej cytoplazmy dotyczyło tylko pojedynczych roślin, a zatem można przypuszczać, że nie przyczyniło się w sposób znaczący do redukcji wartości użytkowej form cms.

Przedstawione badania mają charakter wstępny i planuje się ich kontynuację. Uzyskane wyniki wskazują na zasadność włączenia analiz molekularnych, które pozwoliłyby na określenie ilościowe wirusa w zainfekowanych roślinach. Z kolei przeprowadzenie obserwacji objawów chorobowych w uprawie polowej w warunkach naturalnej infekcji przyczyniłoby się do lepszego doboru form matecznych cms charakteryzujących się wyższą tolerancją na PVY.

WNIOSKI

1. Zmiany w reakcji odpornościowej na PVY alloplazmatycznych form cms w stosunku do płodnej odmiany wyjściowej Zamojska 4 mogą być wynikiem zmian w komunikacji pomiędzy jądrem komórkowym a cytoplazmą pochodzącą od innych gatunków.

2. Zróźnicowanie reakcji form alloplazmatycznych na infekcję PVY pozwala przypuszczać, że ich odpowiedź odpornościowa jest kształtowana przez częściowo odmienne mechanizmy.

3. Zastosowanie cytoplazmy z gatunków *N. amplexicaulis*, *N. debneyi*, *N. exigua*, *N. glauca*, *N. glutinosa*, *N. knightiana* i *N. raimondii* nie przyczyniło się do zmian w poziomie i charakterze reakcji tolerancji alloplazmatycznych form męskosterylnych odmiany Zamojska 4, co świadczy o braku wpływu czynników cytoplazmatycznych na funkcjonowanie mechanizmów odpornościowych tych form cms.

4. Użycie cytoplazmy pochodzącej z gatunków *N. goodspeedii*, *N. megalosiphon*, *N. undulata* spowodowało wzrost tolerancji form cms i opóźnienie wystąpienia objawów, podczas gdy obecność cytoplazmy z gatunków *N. eastii*, *N. occidentalis* i *N. suaveolens* skutkowało obniżeniem tolerancji. Zmiany w reakcji odpornościowej dotyczyły także formy cms z cytoplazmą mutantu *N. tabacum*. Oznacza to, że czynniki zawarte w tych cytoplazmach wpływają na reakcję odpornościową form alloplazmatycznych odmiany Zamojska 4.

PIŚMIENNICTWO

- Berbec A., 1994.** Cytologiczne, morfologiczne i użytkowe właściwości alloplazmatycznych form tytoniu uprawnego *Nicotiana tabacum* L. z cytoplazmą gatunków *N. knightiana* Goodspeed oraz *N. raimondii* Macbride. Rozprawa habilitacyjna, IUNG, Puławy.
- Berbec A., 2001.** Floral morphology and some other characteristics of iso-genomic alloplasmics of *Nicotiana tabacum* L. Beiträge zur Tabakforschung International/Contributions to Tobacco Research, 19(6): 309-314, doi: 10.2478/cttr-2013-0717.
- Berbec A., Doroszevska T., 1992.** Alloplazmatyczne formy tytoniu uprawnego (*Nicotiana tabacum* L.) z podstawioną cytoplazmą gatunków *Nicotiana amplexicaulis*, *N. knightiana* i *N. raimondii*. Pamiętnik Puławski, 100: 141-150.
- Berbec A., Laskowska D., 2005.** Investigations of isogenomic alloplasmics of flue-cured tobacco *Nicotiana tabacum* cv. Wislica. Beiträge zur Tabakforschung International/Contributions to Tobacco Research, 21(5): 258-263, doi: 10.2478/cttr-2013-0791.
- Berbec J., Berbec A., 1992.** Męska jałowosc u tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) uzyskana drogą jednoetapowego podstawienia cytoplazmy gatunku *Nicotiana eastii* Kostoff. Pamiętnik Puławski, 100: 135-139.
- Carlsson J., Glimelius K., 2011.** Cytoplasmic male-sterility and nuclear encoded fertility restoration. ss. 469-491, doi: 10.1007/978-0-387-89781-3_18. W: Plant Mitochondria; ed.: Kempken F., Advances in Plant Biology, vol. 1, Springer, New York, NY.
- Chamandoosti F., 2017.** Defensive mechanism in Plants: The role of component plant cells in defense against biotic and abiotic stresses. International Journal of Environmental and Agriculture Research, 3(7): 15-25.
- Cvetkova M., Alber N.A., Vanlerberghe G.C., 2013.** The signalling role of a mitochondrial superoxide burst during stress.

Plant Signalling and Behavior, 8(1): e22749-161-166, doi: 10.4161/psb.22749.

- Czarnocka W., Karpiński S., 2018.** Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signalling in plant response to environmental stresses. *Free Radical Biology and Medicine*, 122: 4-20, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.011.
- Doroszewska 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.
- Doroszewska T., Depta A., 2011.** Resistance of wild *Nicotiana* species to different PVY isolates. *Phytopathologia*, 59: 9-24.
- Doroszewska T., Depta A., Czubacka A., 2009.** Album gatunków z rodzaju *Nicotiana* /Album of *Nicotiana* species. IUNG-PIB, Puławy.
- Fernandez J.C., Burch-Smith T., 2019.** Chloroplasts as mediators of plant biotic interactions over short and long distances. *Current Opinion in Plant Biology*, 50: 148-155, doi: 10.1016/j.pbi.2019.06.002.
- Julio E., Cotucheau J., Decors 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 potyviruses. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33: 609-623, doi: 10.1007/s11105-014-0775-4.
- Korbecka-Glinka G., Czubacka A., Depta A., Doroszewska T., 2017.** 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.
- Majewska-Sawka A., Sadoch Z., 2003.** Cytoplazmatyczna męska sterylność roślin – mechanizmy biologiczne i molekularne. *Kosmos*, 52(4): 413-423.
- Michel V., Julio E., Candresse T., Cotucheau J., Decors Ch., Volpatti R., Moury B., Glais L., Dorlhac de Borne F., Decroocq V., German-Retana S., 2018.** *NiTPNI*: a RPP8-like R gene required for *Potato virus Y*-induced veinal necrosis in tobacco. *The Plant Journal*, 95, 700-714, doi: 10.1111/tj.13980.
- Nicolaï M., Duprat A., Sormani R., Rodriguez C., Roncato M.-A., Rolland N., Robaglia Ch., 2007.** Higher plant chloroplasts import the mRNA coding for the eucaryotic translation initiation factor 4E. *FEBS Letters*, 581: 3921-3926, doi: 10.1016/j.febslet.2007.07.017.
- Tiziana M., Gallitelli D., 2014.** Synergism in plant-virus interactions: A case study of CMV and PVY in mixed infection in tomato. ss. 195-206, doi: 10.1016/B978-0-12-411584-2.00010-X. W: *Plant Virus-Host Interaction, Molecular Approaches and Viral Evolution*; Gaur R.K., Hohn T., Sharma P., Academic Press, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari, Włochy.

A. Czubacka, A. Depta, T. Doroszewska

DIVERSIFICATION OF DEFENSE RESPONSE TO *POTATO VIRUS Y* AMONG ALLOPLASMIC TOBACCO FORMS

Summary

Cytoplasmic male sterility is used in plant breeding to obtain forms incapable of self-pollination, which are utilized mainly in breeding of hybrid cultivars. It is based on incompatibility between the cell nucleus and cytoplasm because cytoplasmic male sterile plants are obtained by mutation in the cytoplasmic genome or by substitution of the native cytoplasm with another that of a different species. Alloplasmic forms develop modified, non-functional male generative organs or do not develop them at all. Morphological changes may involve other parts of flowers and sometimes a whole plant. An alien cytoplasm may also affect other traits, including resistance to pathogens. In order to determine the effect of alien cytoplasm on tobacco resistance to *Potato virus Y* (PVY), artificial inoculations with two virus isolates differing in virulence were performed. The test included 13 alloplasmic forms of cultivar Zamojska 4 with cytoplasm from *Nicotiana* wild species and a form with cytoplasm from the mutant obtained within *Nicotiana tabacum*. Plant resistance was assessed on the basis of disease symptoms and DAS-ELISA immunoenzymatic test results. Differences were observed in the severity and earliness of disease symptoms. Fertile cultivar Zamojska 4 is considered as tolerant to PVY, that is it reacts to infection with mild symptoms like vein clearing and chlorotic spots of the leaves, but not with vein necrosis. In the case of a combination of cell nucleus from cv. Zamojska 4 and cytoplasm from species *N. goodspeedii*, *N. megalosiphon* and *N. undulata*, alloplasmic forms were not completely resistant, but the level of their tolerance to strong isolate IUNG20 increased compared to that in their male fertile isogenomic counterpart and observed symptoms were delayed. In contrast, tolerance of cms forms with cytoplasm from the species *N. eastii*, *N. occidentalis* and *N. suaveolens* was overcome leading to developing severe disease symptoms. Unlike the other cms forms, the form with the cytoplasm of *N. tabacum* mutant reacted with a development of necrotic symptoms to inoculation with isolate IUNG20, but with delayed mild symptoms when inoculated with the weaker isolate IUNG21. The diversified reaction of different isogenomic alloplasmic forms to viral infection suggests that the mechanisms of defense responses depended on the type of cytoplasm.

Keywords: cytoplasmic male sterility, alloplasmic form, *Potato virus Y*, tobacco, *Nicotiana*

Badania zostały wykonane w ramach Programu Wieloletniego „Tworzenie naukowych podstaw postępu biologicznego i ochrona roślinnych zasobów genowych źródłem innowacji i wsparcia zrównoważonego rolnictwa oraz bezpieczeństwa żywnościowego kraju” koordynowanego przez IHAR-PIB, a finansowanego przez MRiRW.

data zarejestrowania pracy w redakcji Polish Journal of Agronomy: 13 listopada 2019 r.

data uzyskania recenzji: 16 grudnia 2019 r.

data akceptacji: 18 grudnia 2019 r.

Autor

Anna Czubacka

Anna Depta

Teresa Doroszewska

ORCID

0000-0003-1843-6745

0000-0001-7578-5197

0000-0002-2362-7119

