



## Możliwości uzyskiwania odporności na choroby wirusowe tytoniu

Teresa Doroszewska<sup>1</sup>, Anna Maria Chachulska<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa, Puławy

<sup>2</sup> Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

### Attempts at stimulating tobacco resistance to virus diseases

#### Summary

Preliminary investigations were carried out on the transformation of high susceptibility tobacco cultivars. The plants were transformed by being infected with *Agrobacterium tumefaciens* with binary PROK2 – derived plasmids carrying a PVY cassette in the sense and antisense orientations and with a plasmid carrying the lettuce mosaic virus (LMV) coat protein gene. Kanamycin resistant plants were obtained following transformation. PCR testing of a selected group of regenerants revealed the presence of a transgene. Disease symptoms were absent from 52% of transgenic plants inoculated with PVY<sup>N</sup>. This was confirmed by ELISA values.

In the T<sub>1</sub> generation of transgenic plants, 510 (78%) showed no symptoms after inoculation and 155 (22%) showed typical PVY<sup>N</sup> symptoms. Among 510 symptomless plants 213 (36%) were selected as highly resistant, 207 (31%) as partially resistant and 89 (11%) as tolerant.

Forty kanamycin resistant plants of T<sub>2</sub> generation were tested with PVY<sup>N</sup>. Two plants showed vein necrosis, five – vein clearing and 33 plants showed no disease symptoms. ELISA tests allowed to identify 33 plants (84,6%) totally resistant to PVY<sup>N</sup>. The preliminary data reported here showed more resistant plants in T<sub>2</sub> generations.

#### Key words:

tobacco, potato virus Y, transgenic, resistance.

#### Adres do korespondencji

Teresa Doroszewska,  
Instytut Uprawy Nawożenia  
i Gleboznawstwa,  
ul. Czartoryskich 8,  
24-100 Puławy;  
e-mail:  
dorter@iung.pulawy.pl

**biotechnologia**

4 (51) 128–141 2000

## 1. Wstęp

Choroby wirusowe stanowią ważny problem w hodowli i uprawie tytoniu (1). Wynika to z bardzo ograniczonych możliwości ich zwalczania metodami chemicznymi, polegającymi jedynie na usuwaniu wektorów, najczęściej owadów, będących nośnikami wielu chorób wirusowych (2,3).

Do najważniejszych sprawców chorób wirusowych tytoniu zalicza się wirusy z rodzaju *Potyvirus*: *Potato virus Y* (PVY), a zwłaszcza jego nekrotyczne szczepy powodujące brunatną nekrozę nerwów liści oraz *Tobacco Etch Virus* (TEV) i *Tobacco Vein Mottling Virus* (TVMV). (1,2) Duży problem gospodarczy stanowi *Lycopersicum virus 3* Smith, wywołujący brunatną plamistość pomidora na liściach tytoniu *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV). Ponadto istotne znaczenie w uprawach tytoniu na świecie ma wirus mozaiki tytoniu – *Tobacco Mosaic Virus* (TMV), wirus mozaiki ogórka – *Cucumber Mosaic Virus* (CMV), i *Alfalfa Mosaic Virus* (AMV).

Choroby pochodzenia wirusowego o dużym znaczeniu ekonomicznym w Polsce powodowane są głównie przez PVY i TSWV.

Najbardziej efektywnym sposobem przeciwdziałania i zapobiegania chorobom wirusowym jest hodowla odmian odpornych. Hodowla odpornościowa tytoniu prowadzona jest w oparciu na mutacjach oraz krzyżowaniu międzyodmianowym i międzygatunkowym. Największym rezerwuarem genów odporności na czynniki chorobotwórcze są dzikie gatunki *Nicotiana*. Wykorzystując krzyżowanie międzygatunkowe dokonano przeniesienia odporności na TMV od *Nicotiana glutinosa* metodą substytucji (4) oraz metodą addycji (5). Jako źródło odporności na PVY wykorzystano dziki gatunek *N. africana* (6,7), *N. benavidesii* i *N. raimondii* (8). Jedynym źródłem odporności typu nadwrażliwości na TSWV jest *N. alata*. Przeniesienie odporności poprzez skrzyżowanie *N. alata* z *N. tabacum* opisuje Gajos (9).

Wprowadzenie cechy odporności do tytoniu uprawnego, poprzez krzyżowanie z gatunkiem dzikim często wymaga obejścia szeregu barier nieżywotności (10,11) i bezpłodności form mieszańcowych (12). Pozytywne efekty introgresji pożądanej cechy odporności prowadzą do uzyskania cennej plazmy zarodkowej. Praktyczne wykorzystanie takich materiałów wyjściowych wymaga jednak eliminacji niekorzystnych cech pochodzących od gatunku dzikiego, co wydłuża proces hodowlany (13).

Rozwój metod hodowli kultur *in vitro*, genetyki molekularnej i technik rekombinacji DNA przyczynił się do opracowania metod pozwalających na uzyskiwanie odporności na choroby wirusowe poprzez transformację roślin. Zapoczątkowana w 1984 r. metoda krążków liściowych (14) stała się powszechnie stosowaną metodą transformowania tytoniu.

Przeprowadzono wiele udanych eksperymentów metodą transformacji nad uzyskaniem odporności tytoniu na różne choroby wirusowe. Lindbo i Dougherty (15,16) donoszą o przygotowaniu konstruktów w oparciu na białku płaszczu TEV i transformacji nim odmiany Burley 49, uzyskując wysoki stopień odporności roślin. Rośliny tytoniu transformowane genem białka płaszczu jednego ze szczepów mozaiki tytoniowej

(TMV) wykazywały odporność na infekcję TMV, a ponadto rośliny te charakteryzowały się podwyższoną odpornością na inne choroby wirusowe: PVY, PVX, CMV i AMV (17). Wysoki stopień odporności na TSWV uzyskano transformując dwanaście odmian użytkowych tytoniu genem wirusowego białka jądrowego. Wyselekcjonowano nie segregujące linie odporne i przeanalizowano ich dziedziczenie w pokoleniach R3-R6. Odporność na TSWV dziedziczyła się w sposób stabilny w różnych warunkach środowiska (18).

Przedmiotem wielu prac badawczych jest uzyskanie odporności tytoniu na PVY metodą transformacji wykorzystującej gen białka płaszczka wirusa PVY (CP), bądź wirusa mozaiki sałaty LMV (CP) oraz cDNA genu polimerazy PVY.

Gen białka płaszczka PVY-H (węgierskiego izolatu) użyto do transformacji trzech linii hodowlanych tytoniu, uzyskując pięć linii odpornych na infekcję tym wirusem (19). Transgeniczne odmiany tytoniu typu burley i papierosowego jasnego otrzymano w wyniku transformacji genem CP chilijskiego izolatu PVY (PVY-Chilean). Wśród potomstwa transformowanych odmian obserwowano odporność na inne nekrotyczne izolaty tego wirusa (20).

Transgeniczne rośliny tytoniu odmiany Xanthi uzyskano w wyniku transformacji genem wirusa mozaiki sałaty (21). Potomstwo tych linii wykazywało odporność na PVY-NV oraz na cztery inne szczepy PVY. Pozytywne efekty transformacji tytoniu odmiany Burley 21 obserwowano używając komplementarnego DNA (cDNA) genu replikazy PVY (22). Rośliny odmiany Turkish Samsun NN transformowano genem (N1b) zwykłego szczepu PVY-0 (PVY<sup>0</sup>). Z trzynastu niezależnie transformowanych linii potomstwo czterech było odporne na infekcję PVY<sup>0</sup>. W pokoleniu R<sub>2</sub> trzynaście z piętnastu testowanych roślin wykazywało odporność na ten szczep (23).

## 2. Cel prac

Celem prowadzonych badań było uzyskanie odporności na nekrotyczne szczepy wirusa Y ziemniaka (PVY) u podatnych odmian użytkowych tytoniu charakteryzujących się dobrymi cechami jakościowymi. Uprawa tych odmian, w warunkach nasilenia w naszym kraju PVY związanego z dużym arealem ziemniaka wymaga wprowadzenia genów odporności na ten wirus. Podjęto próby transformacji odmian tytoniu zmodyfikowanym, wybranym genem z izolatu PVY występującego powszechnie w warunkach naturalnej infekcji polowej, oraz konstruktu niosącego gen białka płaszczka wirusa mozaiki sałaty (pKYXLMVCP).

Przeprowadzono wstępną analizę uzyskanej tą metodą zmienności genetycznej.

## 3. Materiał i metody

Do transformacji wykorzystano cztery wysoce podatne na PVY<sup>N</sup> odmiany uprawne tytoniu: MacNair 944 (MN 944), BY103, K326 i ACGayed. Transformację prowa-

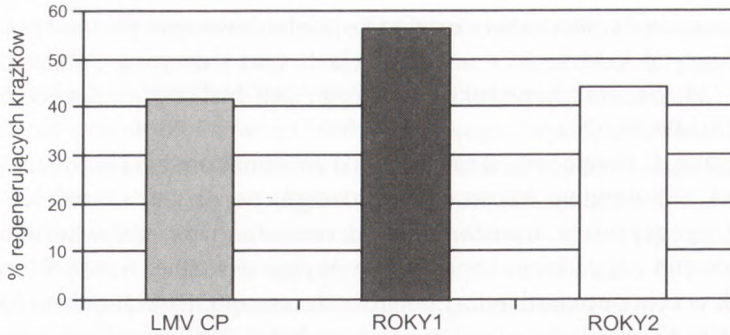
dzono przy użyciu *Agrobacterium tumefaciens* z wbudowanymi plazmidami binarnymi pROK2, niosącymi kasetkę PVY w orientacjach sens i antysens (plazmidy pROKY1 i pROKY2), (24,25), oraz konstruktu niosącego gen białka płaszczka wirusa mozaiki sałaty (pKYXLMVCP), (21).

Inkubowane *A. tumefaciens* skrawki tkanki roślinnej umieszczano na pożywce regeneracyjnej z dodatkiem kanamycyny (50 mg/l) po ok. 40 skrawków w każdym obiekcie. Zregenerowane transformanty przenoszono na pożywkę ukorzeniającą i selekcionowano przy użyciu kanamycyny. Wybrane rośliny transgeniczne badano metodą PCR w celu potwierdzenia obecności transgeny. Ekstrahowano roślinny, genomowy DNA. Krążki liściowe ucierano w próbkach Eppendorfa odpowiednimi tłuczkami, do uzyskania homogennej zawiesiny. Dodawano 400  $\mu$ l buforu do ekstrakcji (200 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS), próbki wortexowano przez 5 s i pozostawiano w temperaturze pokojowej do jednej godziny. Po zwirowaniu (5 min przy 13 krpm), 300  $\mu$ l supernatantu przenoszono do nowej próbki, mieszano z 300  $\mu$ l zimnego izopropanolu i pozostawiano w temperaturze pokojowej na 2 min. Próbkę wirowano przy 13 krpm przez 15 min, w temp. 4°C płukano 70% etanolem, osady suszono i zawieszano w 50-100  $\mu$ l TE. DNA przechowywano w temperaturze -25°C. Do reakcji PCR stosowano 2-4  $\mu$ l DNA na 50  $\mu$ l całkowitej reakcji. DNA amplifikowano przy użyciu polimerazy Taq (Promega) lub PrimeZyme (Biometra). W standardowej reakcji 1-4  $\mu$ l DNA (około 20 ng/ $\mu$ l) dodawano do mieszaniny reakcyjnej, zawierającej 25 ng każdego z pary primerów, 1x bufor PCR, 2  $\mu$ l 10 mM deoksynukleotydy i 2 jednostki polimerazy, w końcowej objętości 50  $\mu$ l. PCR prowadzono według następującego programu: wstępna denaturacja w 94°C przez 4 min, 30 cykli w 30 s. w 94°C (denaturacja), 30 s. w 55-58°C, 30 s. w 72°C (elongacja) i końcowa elongacja 10 min w 72°C. 5-10  $\mu$ l każdej próbki analizowano w 1% żelu agarozowym, stosując bromek etydy, który interkaluje się w wiązania DNA, dzięki czemu jest widoczny w świetle UV. Na podstawie szybkości migracji zamplifikowanych odcinków DNA identyfikowano uzyskane prążki stosując porównanie z odpowiednim markerem oraz z pozytywną kontrolą. Identyfikację i dokumentację żelu agarozowego prowadzono przy użyciu transiluminatora UV i systemu BioDoc.

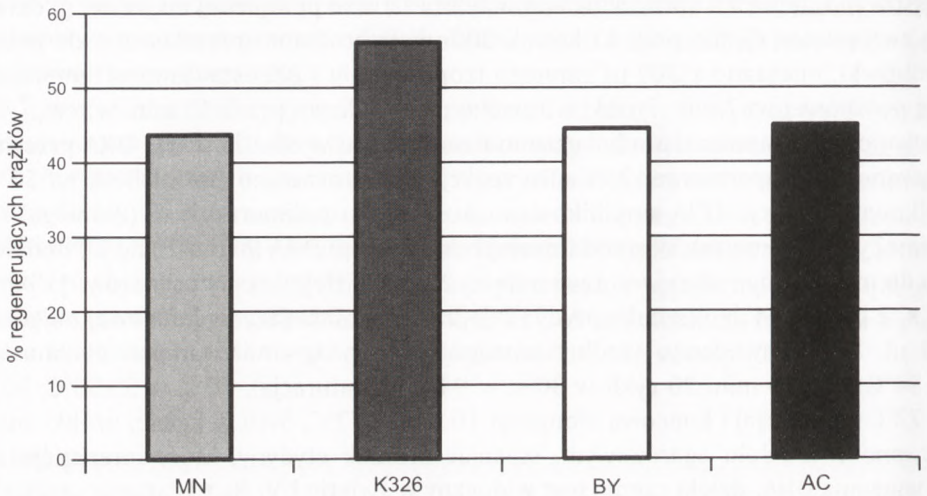
Inokulację roślin transgenicznych prowadzono przy użyciu nekrotycznego szczepu Y<sup>N</sup> występującego w warunkach naturalnej infekcji. Do detekcji obecności wirusa w inokulowanych roślinach stosowano testy ELISA z użyciem surowicy firmy BIOREBA.

#### 4. Dyskusja

Cztery odmiany tytoniu: MacNair 994, BY 103, K326 i AC Gayed transformowano plazmidami: pROK2 niosącym kasetkę w orientacji sens i antysens (plazmidy pROKY1 i pROKY2) oraz pKYXLMVCP zawartymi w *Agrobacterium tumefaciens*.



Rys. 1. Zdolność regeneracji transformowanych liści tytoniu przy użyciu trzech konstruktów.

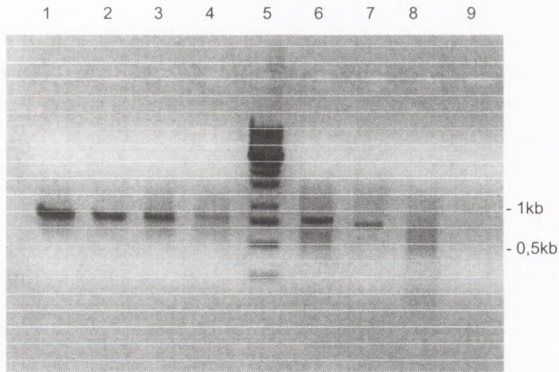


Rys. 2. Zdolność regeneracji czterech transformowanych odmian tytoniu.

### Pokolenie T<sub>0</sub>

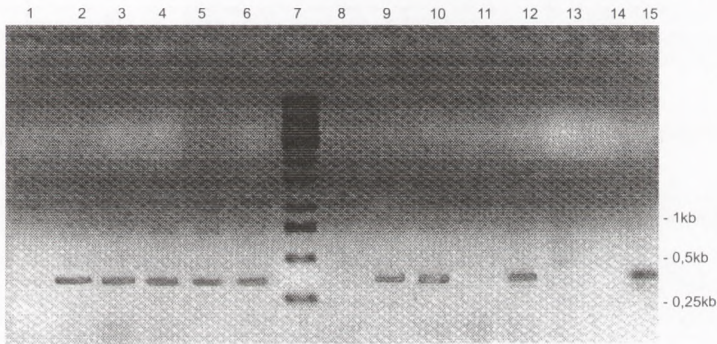
Najwyższą zdolność do regeneracji na pożywce z kanamycyną wykazywały krążki liściowe transformowane plazmidem pROKY1 (56%), niższą pROKY2 (43,9%) i LMV CP (41,7%), (rys. 1). Porównując regenerację wśród użytych genotypów najwyższą skuteczność wykazywała odmiana K326 (56,1%), pozostałe odmiany regenerowały na podobnym poziomie (rys. 2). Nie stwierdzono regeneracji nie transformowanych skrawków na podłożach selekcyjnych. Pod względem morfologicznym roślin transgeniczne nie różniły się od roślin nie transformowanych.

Detekcja wybranych roślin transgenicznych metodą PCR i elektroforezy w żelu agarozowym wykazała obecność wprowadzonego genu wirusowego w genomie roślin transformowanych przy użyciu pROKY i LMV CP (rys. 3, 4).



Rys. 3. Produkty amplifikacji metodą PCR cDNA LMV CP wstawionego do genomu transgenicznych roślin tytoniu T<sub>0</sub>.

Ścieżki: 1 – kontrola pozytywna (pKYL MVCP); 2 – MN 944; 3,4 – K326; 5 – marker 1 kB Fermentas; 6,7 MN 944; 8 – kontrola negatywna (roślina nie transformowana); 9 – kontrola negatywna (woda).



Rys. 4. Produkty amplifikacji metodą PCR cDNA wirusa PVY (pROKY) wstawionego do genomu transgenicznych roślin tytoniu T<sub>0</sub>.

Ścieżki: 1 – kontrola negatywna (woda); 2-6 – rośliny transgeniczne MN 944; 7 – marker 1 kB Fermentas; 8 – kontrola negatywna (roślina nie transformowana); 9-14 – rośliny transformowane K326; 15 – kontrola pozytywna (plazmid pROKY1).

W badaniach odpornościowych na PVY uwzględniono 420 roślin pokolenia T<sub>0</sub>, zregenerowanych na selekcyjnej pożywce, należące do czterech transformowanych odmian (tab. 1). Część roślin uległa porażeniu, dając typowe objawy nekrozy nerwów (NV). Wśród roślin bezobjawowych testy ELISA pozwoliły wyodrębnić trzy grupy różniące się koncentracją wirusa. Do pierwszej grupy zaliczono rośliny, których wartości testu ELISA wynosiły powyżej 0,9 i niektóre z roślin wykazywały chloro-

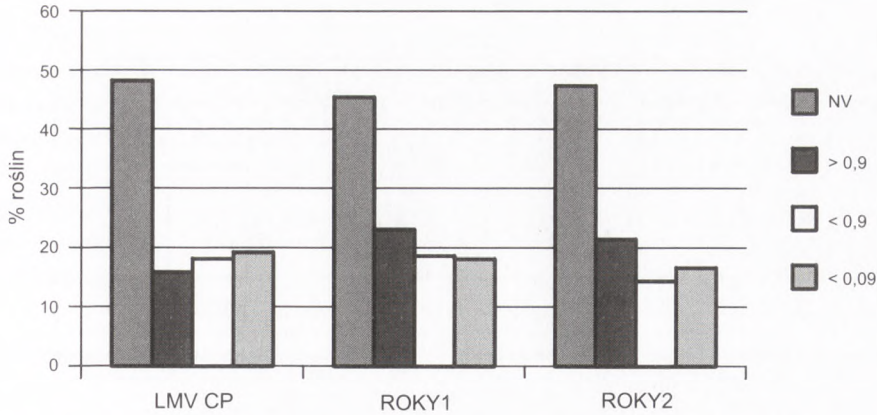
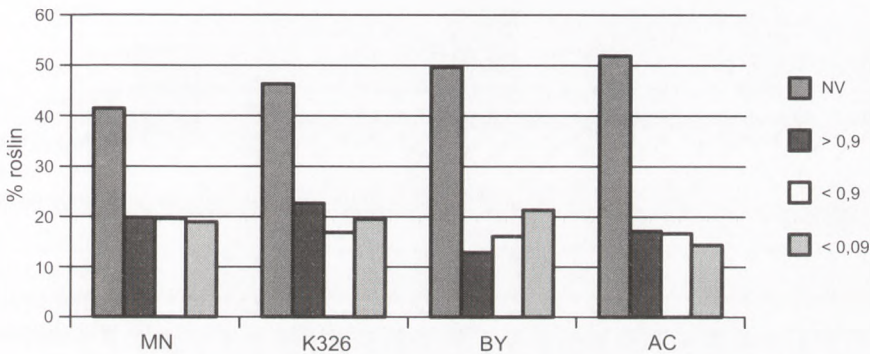
tyczne plamy, drugą grupę stanowiły rośliny o wartościach 0,1-0,9 i trzecią – poniżej 0,09 (tab. 1). Grupę trzecią definiowano jako wysoce odporną i tylko potomstwo tych roślin stanowiło przedmiot dalszych badań.

Tabela 1

Odporność roślin transgenicznych pokolenia T<sub>0</sub> na PVY<sup>N</sup>

Odmiana i konstrukt	Inokulacja PVY <sup>N</sup>				
	Liczba roślin zakażanych	% roślin z NV	Testy ELISA roślin bezobjawowych (w %)		
			> 0,9	0,1-0,9	0,000-0,09
MN944 LMV CP	123	42,3	16,2	20,3	21,1
MN944 pROKY1	45	40	22,2	17,7	20
MN944 pROKY2	19	42,2	21	21	15,7
<i>MN944 (razem)</i>	<i>187</i>	<i>41,5</i>	<i>19,8</i>	<i>19,6</i>	<i>18,9</i>
K326 LMV CP	54	50	18,5	16,6	14,8
K326 pROKY1	41	39	21,9	19,5	19,5
K326 pROKY2	40	50	27,5	10	12,5
<i>K326 (razem)</i>	<i>135</i>	<i>46,3</i>	<i>22,6</i>	<i>16,8</i>	<i>19,5</i>
BY103 LMVCP	23	52,2	8,6	17,4	21,7
BY103 pROKY1	15	46,6	13,3	20	20
BY103 pROKY2	18	50	16,6	11,1	22,2
<i>BY103 (razem)</i>	<i>56</i>	<i>49,6</i>	<i>12,8</i>	<i>16,1</i>	<i>21,3</i>
AC Gayed pROKY1	23	56,5	13	17,4	13
AC Gayed pROKY2	19	47,3	21,2	15,8	15,7
<i>AC Gayed (razem)</i>	<i>42</i>	<i>51,9</i>	<i>17,1</i>	<i>16,6</i>	<i>14,4</i>
<b>Razem</b>	<b>420</b>	<b>47,3</b>	<b>18,0</b>	<b>17,3</b>	<b>18,5</b>

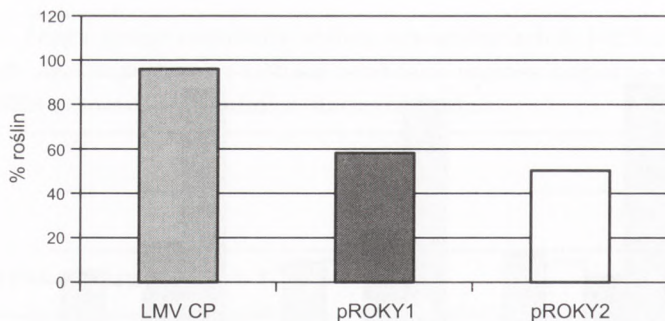
Ogółem 47,3% zakażanych roślin pokolenia T<sub>0</sub> wykazywało objawy nekrozy nerwów. Nie obserwowano wyraźnych różnic odporności roślin w zależności od użytego konstrukt (rys. 5), oraz w zależności od odmiany (rys. 6). E. K. Park i in. donoszą o braku roślin odpornych przy użyciu konstrukt cDNA replikazy w orientacji anty-sens (22). Z uwagi na przydatność w programie hodowlanym najbardziej interesującą grupę stanowiły rośliny wysoce odporne (18,5%). Skuteczność transformacji kilku odmian tytoniu oceniana liczbą roślin odpornych przez Sudarsono i in. (20) kształtowała się na podobnym poziomie.

Rys. 5. Wpływ badanych konstruktw na odporność roślin pokolenia T<sub>0</sub> na PVY<sup>N</sup>.Rys. 6. Odporność roślin pokolenia T<sub>0</sub> czterech odmian tytoniu na PVY<sup>N</sup>.

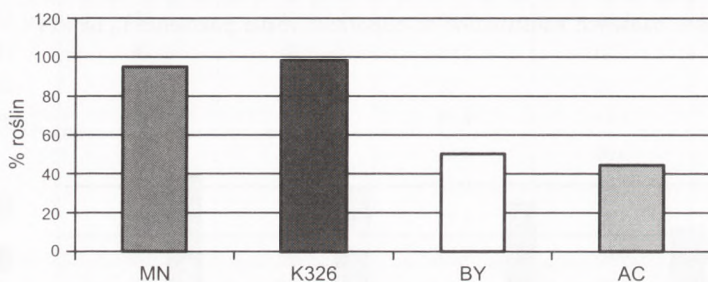
### Pokolenie T<sub>1</sub>

Nasiona zebrane z roślin o wysokiej odporności na PVY wysiano na pożywkę selekcyjną z kanamycyną, a następnie wysadzono na pożywkę wzrostową, również z dodatkiem kanamycyny. Z około 520 siewek będących potomstwem roślin transformowanych przy użyciu LMV CP – 96% siewek wykazywało dobry wzrost. Zdecydowanie niższy – 58,1% siewek dobrze rosnących uzyskano z nasion transformowanych konstruktem pROKY1 i 50,3% siewek transformowanych konstruktem pROKY2 (rys. 7). Porównując transfer transgeny u poszczególnych odmian najwyższy procent roślin opornych na kanamycynę obserwowano u odmiany K326 (98%) i MN 944 (95%). Zdecydowanie mniej roślin opornych na kanamycynę uzyskano w obrębie odmiany BY 103 (50,3%) i AC Gayed (44,5%), (rys. 8).



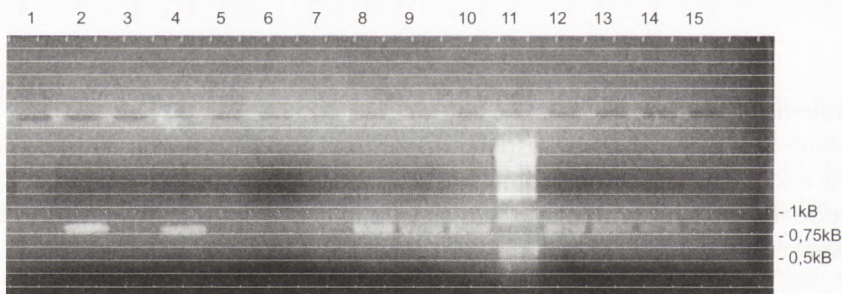


Rys. 7. Kielkowanie i wzrost roślin transgenicznych pokolenia T<sub>1</sub> na pożywce z kanamycyną w zależności od użytego konstruktów.



Rys. 8. Kielkowanie i wzrost roślin transgenicznych pokolenia T<sub>1</sub> czterech odmian tytoniu na pożywce z kanamycyną.

W przeprowadzonej analizie produktów amplifikacji PCR w żelu agarozowym wybranych roślin transgenicznych T<sub>1</sub> wykazano segregację transferu wbudowanego fragmentu w pokoleniu T<sub>0</sub> (rys. 9). W niektórych roślinach nie wykryto cDNA PVY – ścieżki 5,6 i 7, w innych obserwowano słaby sygnał – ścieżki 14 i 15.



Rys. 9. Produkty amplifikacji metodą PCR cDNA LMV CP wstawionego do genomu transgenicznych roślin tytoniu T<sub>0</sub>.

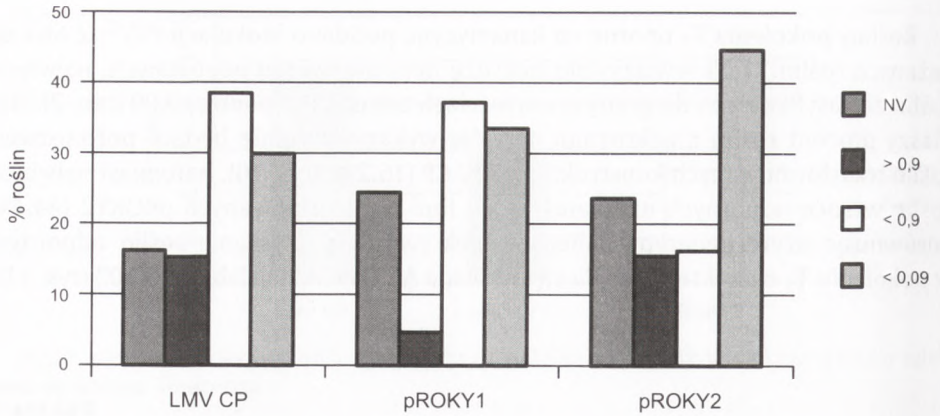
Ścieżki: 1 – kontrola negatywna (woda); 2 – kontrola pozytywna (plazmid pKYL MVCP); 3 – kontrola negatywna (roślina nie transformowana); 4-10 – potomstwo roślin transformowanych BY103; 11 – marker 1 kb (BRL); 12-15 – potomstwo roślin transformowanych K326.

Rośliny pokolenia T<sub>1</sub> odporne na kanamycynę poddano inokulacji PVY<sup>N</sup>. Z 664 zakażanych roślin 21,5% wykazywało nekrozę nerwów, wśród pozostałych, najwięcej roślin zaklasyfikowano do grupy o wartościach testu ELISA poniżej 0,09 (tab. 2). Najniższy procent roślin z nekrozami nerwów wykazywały linie będące potomstwem roślin transformowanych konstruktem LMV CP (16,2%), (rys. 10), natomiast najwięcej roślin wysoce odpornych uzyskano wśród linii transformowanych pROKY2 (44,4%). Porównując użyte genotypy najlepszą efektywnością uzyskania roślin odpornych w pokoleniu T<sub>1</sub> charakteryzowała się odmiana AC Gayed, najłabszą BY103 (rys. 11).

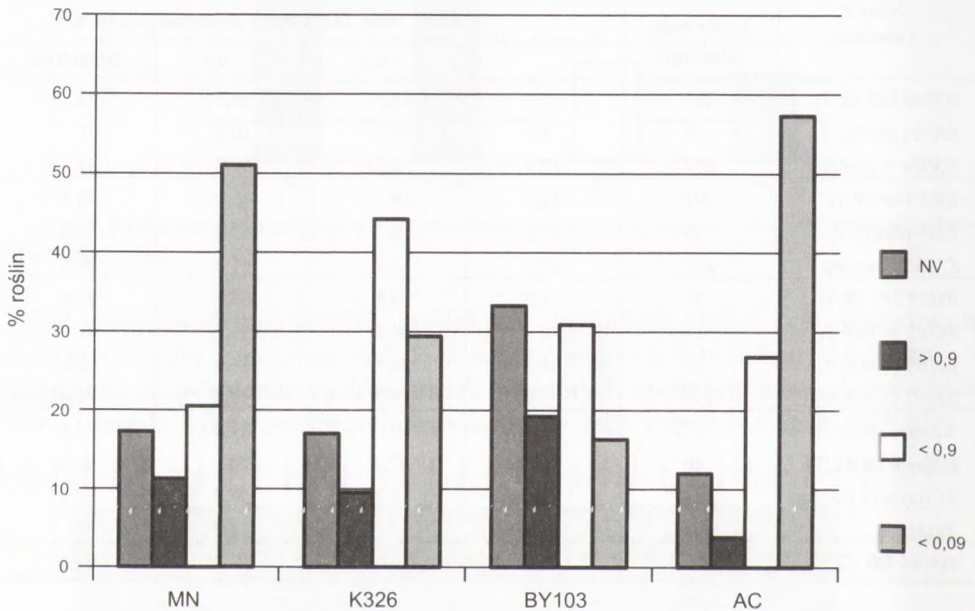
Tabela 2

Odporność roślin transgenicznych pokolenia T<sub>1</sub> i T<sub>2</sub> na PVY<sup>N</sup>

Odmiana i konstrukct	Inokulacja PVY <sup>N</sup>				
	Liczba roślin zakażanych	% roślin z NV	Testy ELISA roślin bezobjawowych (w %)		
			> 0,9	0,1-0,9	0,000-0,09
MN944 LMV CP T <sub>1</sub>	228	32	12,3	30,7	25
MN944 pROKY2 T <sub>1</sub>	39	2,6	10,2	10,2	77
<i>MN944 T<sub>1</sub> (razem)</i>	<i>267</i>	<i>17,3</i>	<i>11,25</i>	<i>20,5</i>	<i>51</i>
K326 LMV CP T <sub>1</sub>	102	14,7	19	46,1	20,5
K326 pROKY1 T <sub>1</sub>	26	19,2	0	42,3	38,4
<i>K326 T<sub>1</sub> (razem)</i>	<i>128</i>	<i>17</i>	<i>9,5</i>	<i>44,2</i>	<i>29,4</i>
BY103 LMV CP T <sub>1</sub>	54	1,9	14,8	38,8	44,4
BY103 pROKY1 T <sub>1</sub>	14	50	14,2	35,7	0
BY103 pROKY2 T <sub>1</sub>	87	48,3	28,7	18,4	4,6
<i>BY103 T<sub>1</sub> (razem)</i>	<i>155</i>	<i>33,3</i>	<i>19,2</i>	<i>30,9</i>	<i>16,3</i>
ACGayed pROKY1T <sub>1</sub>	74	4	0	33,8	62,1
ACGayed pROKY2T <sub>1</sub>	40	20	7,5	20	52,5
<i>AC Gayed T<sub>1</sub> (razem)</i>	<i>114</i>	<i>12</i>	<i>3,75</i>	<i>26,8</i>	<i>57,3</i>
<b>Razem T<sub>1</sub></b>	<b>664</b>	<b>21,5</b>	<b>12</b>	<b>31,1</b>	<b>36</b>
MN944 LMV CP T <sub>2</sub>	40	2,6	2,6	10,2	84,6



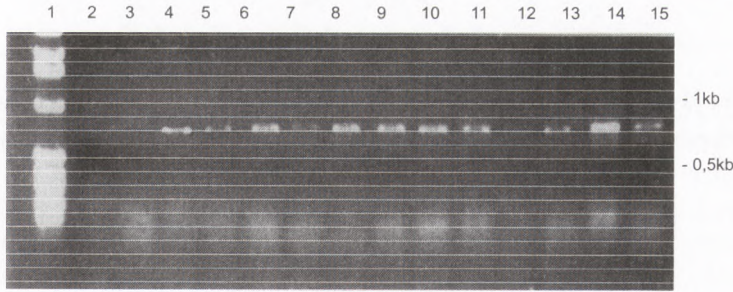
Rys. 10. Wpływ badanych konstruktyw na odporność tytoniu pokolenia T<sub>1</sub> na PVYN



Rys. 11. Odporność roślin pokolenia T<sub>1</sub> czterech odmian tytoniu na PVYN.

### Pokolenie T<sub>2</sub>

Oporne na kanamycynę siewki roślin będące potomstwem wysoce odpornej na PVYN linii T<sub>1</sub> MN944 transformowanej LMV CP uwzględniono w badaniach nad ekspresją wbudowanego transgeny. Detekcja produktów amplifikacji w żelu agarowym wykazała obecność fragmentu w większości badanych roślin pokolenia T<sub>2</sub>

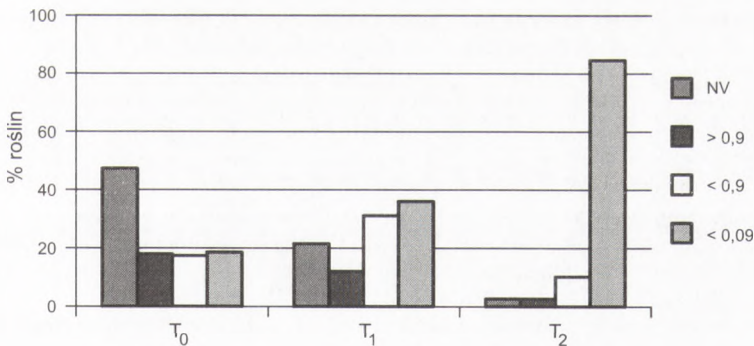


Rys. 12. Produkty amplifikacji metodą PCR cDNA LMV CP wstawionego do genomu transgenicznych roślin tytoniu T<sub>2</sub>.

Ścieżki: 1 – marker 1 kb (BRL); 2 – kontrola negatywna (woda); 3 – kontrola negatywna (roślina nie transformowana); 4-13,15 – rośliny transgeniczne MN944; 14 – kontrola pozytywna (plazmid pKYL MVCP).

(rys. 12). Z 39 roślin poddanych inokulacji PVY<sup>N</sup>, tylko 2,6% wykazywało nekrozy nerwów, zaś 84,6% było całkowicie odpornych (tab. 2).

Porównując odporność roślin w pokoleniu T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> i T<sub>2</sub> widać wyraźnie wzrost roślin wysoce odpornych (rys. 13). Stosunek roślin odpornych do roślin z NV pokolenia T<sub>1</sub> w dotychczasowych badaniach kształtował się na poziomie 4:1; zaś w pokoleniu T<sub>2</sub> 40:1. E.K. Park i in. (22) w swoim eksperymencie wykazali odpowiednio stosunek 3:1 w pokoleniu T<sub>1</sub> i 4:1 w pokoleniu T<sub>2</sub>. Analiza ekspresji cechy odporności w pozostałych liniach, będących aktualnie w badaniach, pozwoli zapewne uzyskać autorkom pełniejsze wyniki na temat dziedziczenia tej cechy.



Rys. 13. Odporność roślin tytoniu pokolenia T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> i T<sub>2</sub> na PVY<sup>N</sup>.

## 5. Podsumowanie

Wykorzystanie metody transformacji roślin daje duże możliwości w pozyskaniu odporności na choroby wirusowe tytoniu. Przeprowadzone eksperymenty w wielu placówkach naukowych na świecie jak też przedstawione wyniki badań własnych autorek świadczą o skuteczności tej metody w stosunku do różnych genotypów tytoniu oraz różnych chorób wirusowych. Niezwykle istotny jest fakt, że bardzo często konstrukty opracowane na bazie jednego szczepu czy izolatu danego wirusa są skuteczną obroną przed pozostałymi szczepami tego wirusa, a niekiedy przed innymi wirusami, nie należącymi do tego samego rodzaju. Drugą ważną cechą tej metody jest często podkreślany, mendelowski sposób dziedziczenia pozyskanej odporności, co ułatwia selekcję pożądaną zmienności. W porównaniu do metody klasycznej, opartej najczęściej na krzyżowaniu międzygatunkowym, transformacja nie prowadzi do tak dalekich zmian w konfiguracji genetycznej uzyskanego genotypu, jak ma to miejsce w mieszańcach międzygatunkowych. Proces selekcji w kierunku utrzymania odporności i jednocześnie nieodzownej, wysokiej jakości staje się zatem krótszy i efektywniejszy.

## Literatura

1. Lucas G. B., (1975), *Diseases of Tobacco*, Biological Consultants Associates, Raleigh North Carolina, 425-547.
2. Shew H. D., Lucas G. B., (1998), *Compendium of Tobacco Diseases*, The American Phytopathological Society, 41-47.
3. Opoka B., (1970), *Pam. Puł.*, 40, 101-133.
4. Holmes F. O., (1938), *Phytopathology*, 28, 533-561.
5. Gerstel D. U., (1945), *Hered. J.*, 36, 197-206.
6. Doroszewska T., (1995), *Materiały drugiego krajowego sympozjum*, IHAR, Radzików, 77-79.
7. Lucas G. B., Gooding G. V., Sasser J. N., Gerstel D. U., (1980), *Tob. Sci.*, 24, 141-142.
8. Berbec A., (1988), *Genetica Polonica*, 29, 3-4, 323-333.
9. Gajos Z., (1981), *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 224, 118-126.
10. Doroszewska T., (1994), *Prace Ogródu Botanicznego PAN*, 5/6, 465-472.
11. Nikova V. M., Zagórska N. A., (1990), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 32-1, 71-75.
12. Goodspeed T. H., (1954), *The Genus Nicotiana. Chronica Botanica*, Waltham, Mass., USA (199-206).
13. Doroszewska T., Berbec A., (1999), CORESTA Joint Meet. Agro-Phyto Groups (AP 4), 11.
14. Horsch R. B., Fry J. E., Hoffman N. L., Eichholtz D., Rogers S. G., Fraley R. T., (1985), *Science*, 227, 1229-1231.
15. Lindbo J. A., Dougherty W. G., (1992), *Virology*, 189, 725-733.
16. Lindbo J. A., Dougherty W. G., (1992), *Mol. Plant-Microbe Inter.*, 5, 144-153.
17. Anderson E. J., Stark D. M., Nelson R. S., et al., (1989), *Phytopathology*, 79-11, 1284-1290.
18. Stoeva P., Yankulova M., Nikolaeva V., (1998), *Mol. Breed.*, 4-2, 155-164.
19. Kollar A., Balazs E., (1993), CORESTA Meet. Agro-Phyto Groups, Budapest.
20. Sudarsono J. B., Young S. L., Woloshuk D. C., PARRY G. M. & al. (1995), *Phytopathology*, 85, 12, 1493-1499.
21. Dinant S., Blaise F., Kusiak C., Astier-Manificier S., Albouy J., (1993), *Phytopathology*, 83, 8, 818-824.

22. Park E. K., Kim Y. H., Paek K. H., Chae S. Y., Kang S. W., (1996), Inf. Bul. CORESTA, Japan, 162.
23. Audy P., Palukaitis P., Slack S. A., Zailtin M., (1994), Mol. Plant-Microbe Inter., 7, 15-22.
24. Chachulska A. M., Chrzanowska M., Flis B., Krzymowska M., Lipska-Dwuźnik A., Robgalia C., Zagórski W., (1997), Biotechnologia, 4, 39, 48-54.
25. Doroszevska T., Chachulska A., (1997), Zeszyty Nauk. AR w Krakowie, 318, 50, 469-474.