



INSTYTUT UPRAWY NAWOŻENIA I GLEBOZNAWSTWA  
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

# Rozprawa doktorska

mgr inż. Anna Depta

**Ocena zasobów genowych rodzaju *Nicotiana* pod  
względem odporności na najważniejsze choroby wirusowe  
tytoniu**

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

**Promotor:** prof. dr hab. Teresa Doroszewska

**Promotor pomocniczy:** dr Anna Czubačka

Puławy 2023

## **Podziękowania**

*Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania dla Pani **prof. dr hab. Teresy Doroszewskiej** za nieocenioną pomoc, opiekę merytoryczną i nieustanną motywację na każdym etapie badań oraz podczas pisania rozprawy doktorskiej, a także za życzliwość, cierpliwość i poświęcony mi czas.*

*Podziękowania kieruję również do Pani **dr Anny Czubackiej** oraz Koleżanek i Kolegów z **Zakładu Hodowli i Biotechnologii Roślin** za wszelkie wsparcie i pomoc w realizacji badań.*

*Wyrazy wdzięczności składam również mojemu mężowi za Jego niezachwianą wiarę we mnie oraz dzieciom za wyrozumiałość i wsparcie.*

## SPIS TREŚCI

1. Spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	6
2. Wstęp.....	7
3. Hipoteza i cel badań.....	10
4. Przegląd literatury.....	11
4.1. Charakterystyka rodzaju <i>Nicotiana</i> .....	11
4.2. Główne patogeny wirusowe powodujące choroby tytoniu.....	20
4.2.1. Wirus Y ziemniaka ( <i>Potato virus Y</i> , PVY).....	20
4.2.2. Wirus brązowej plamistości pomidora na tytoniu ( <i>Tomato spotted wilt virus</i> , TSWV).....	23
4.2.3. Wirus mozaiki tytoniu ( <i>Tobacco mosaic virus</i> , TMV).....	24
5. Materiał i metody.....	26
5.1. Materiał badawczy.....	26
5.2. Metody badawcze.....	27
5.2.1. Testy odpornościowe.....	27
5.2.1.1. Inokulacja wirusem PVY.....	27
5.2.1.2. Inokulacja wirusem TSWV.....	28
5.2.1.3. Inokulacja wirusem TMV.....	28
5.2.2. Testy serologiczne.....	28
5.2.3. Testy molekularne.....	29
5.2.3.1. Izolacja DNA.....	29
5.2.3.2. Warunki reakcji PCR.....	29

6. Wyniki.....	30
6.1. Źródła odporności na PVY.....	31
6.2. Źródła odporności na TSWV.....	37
6.3. Źródła odporności na TMV.....	42
7. Dyskusja.....	44
7.1. Ocena odporności na PVY w obrębie rodzaju <i>Nicotiana</i> .....	45
7.2. Ocena odporności na TSWV w obrębie rodzaju <i>Nicotiana</i> .....	50
7.3. Ocena odporności na TMV w obrębie rodzaju <i>Nicotiana</i> .....	54
8. Podsumowanie i wnioski.....	56
9. Literatura.....	58
10. Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim.....	72
11. Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku angielskim.....	75
12. Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	78
12.1. Doroszeńska T., Depta A. 2011. Resistance of wild <i>Nicotiana</i> species to different PVY isolates. <i>Phytopathologia</i> , 59: 9-24.	
12.2. Depta A., Doroszeńska T., Czubańska A. 2020. Zróżnicowanie reakcji odpornościowej wybranych odmian tytoniu ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) w zależności od użytego izolatu wirusa Y ziemniaka”. <i>Polish Journal of Agronomy</i> , 42, 3-13.	
12.3. Depta A., Doroszeńska T., Czubańska A. 2021. Resistance response of the recently discovered species <i>Nicotiana mutabilis</i> to <i>Potato virus Y</i> (PVY) and <i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV) compared to other sources of resistance. <i>Agronomy</i> , 11(8): 1617; <a href="https://doi.org/10.3390/agronomy11081617">https://doi.org/10.3390/agronomy11081617</a>	
12.4. Laskowska D., Doroszeńska T., Depta A., Kurska K., Olszak-Przybyś H., Czubańska A. 2013. A survey of <i>Nicotiana</i> germplasm for resistance to <i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV). <i>Euphytica</i> , 193 (2): 207-219.	

12.5. Depta A., Kursa K., Doroszevska T., Laskowska D., Trojak-Goluch A. 2018.  
Reaction of *Nicotiana* species and cultivars of tobacco to *Tobacco Mosaic Virus*  
and detection of the *N* gene that confers hypersensitive resistance. Czech J. Genet.  
Plant Breed. 54 (3): 143-146.

13. Oświadczenie doktoranta i współautorów dotyczące wkładu w przygotowanie publikacji.....140
14. Oświadczenie promotora, promotora pomocniczego i autora rozprawy doktorskiej.....148

## 1. Spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi następujące publikacje:

Lp.	Bibliografia	IF w roku 2021	IF 5-letni	Punktacja MNiSW	
				Przed 21.12. 2021	Po 21.12 2021
1	Doroszevska T., Depta A. 2011. Resistance of wild <i>Nicotiana</i> species to different PVY isolates. <i>Phytopathologia</i> , 59: 9-24.	-	-	20*	-
2	Depta A., Doroszevska T., Czubačka A. 2020. Zróźnicowanie reakcji odpornościowej wybranych odmian tytoniu ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) w zależności od użytego izolatu wirusa Y ziemniaka”. <i>Polish Journal of Agronomy</i> , 42, 3-13.	-	-	10	20
3	Depta A., Doroszevska T., Czubačka A. 2021 Resistance response of the recently discovered species <i>Nicotiana mutabilis</i> to <i>Potato virus Y</i> (PVY) and <i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV) compared to other sources of resistance. <i>Agronomy</i> , 11(8): 1617; <a href="https://doi.org/10.3390/agronomy11081617">https://doi.org/10.3390/agronomy11081617</a>	3,949	4,117	-	100
4	Laskowska D., Doroszevska T., Depta A., Kursa K., Olszak-Przybyś H., Czubačka A. 2013. A survey of <i>Nicotiana</i> germplasm for resistance to <i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV). <i>Euphytica</i> , 193 (2): 207-219.	2,185	2,387	35	70
5	Depta A., Kursa K., Doroszevska T., Laskowska D., Trojak-Goluch A. 2018. Reaction of <i>Nicotiana</i> species and cultivars of tobacco to <i>Tobacco Mosaic Virus</i> and detection of the <i>N</i> gene that confers hypersensitive resistance. <i>Czech J. Genet. Plant Breed.</i> 54 (3): 143-146.	1,304	1,277	20	40
<b>Razem</b>		7,438	7,781	85	230

\*- czasopismo istniało do 2012 roku

## 2. Wstęp

Niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych, zgodnie z ustawą prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. z 2023 r. poz. 742) oraz Regulaminami Rady Naukowej IUNG-PIB (Uchwała nr 13/2018 z dnia 27 marca 2018 r. oraz Uchwała nr 86/2019 z dnia 18 września 2019 r.).

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi pięć artykułów naukowych. Sumaryczny Impact Factor publikacji stanowiących zbiór artykułów wynosił 6,177 w 2020 roku, a suma IF z 5-lecia wynosiła 6,838. Liczba punktów wg wykazu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) sprzed 21.12. 2021 wynosiła 85, zaś zgodnie z wykazem opublikowanym dnia 21.12.2021 – 230 MNiSW. Artykuły zostały załączone na końcu niniejszej rozprawy jako rozdział 12.

Wszystkie prace stanowiące rozprawę dokorską dotyczyły oceny odporności zasobów genowych rodzaju *Nicotiana* na choroby wirusowe. Badania obejmowały dzikie gatunki *Nicotiana* oraz wybrane odmiany *N. tabacum* pochodzące z kolekcji IUNG-PIB w Puławach. Zasoby genowe stanowią niezwykle cenny materiał pod względem zmienności i z tego powodu niezmiernie ważne jest ich gromadzenie, utrzymywanie w czystości genetycznej oraz ocena ich zróżnicowania.

Początki zasobów genowych rodzaju *Nicotiana* w Puławach sięgają lat dwudziestych ubiegłego wieku, wtedy to prof. Lucjan Kaznowski rozpoczął gromadzenie odmian i dzikich gatunków jako źródła odporności na choroby oraz w celu ulepszenia ówczesnych materiałów hodowlanych pod względem cech jakościowych. Wraz z rozwojem hodowli wzrastała potrzeba gromadzenia i oceny nowych gatunków i odmian, które pozyskiwano z wielu placówek naukowych na świecie i włączano je do tworzącej się kolekcji. Prowadzona obecnie w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowym Instytucie Badawczym kolekcja rodzaju *Nicotiana* jest jedną z większych w Europie i obejmuje 1008 obiektów. W jej skład wchodzi 145 obiektów należących do dzikich gatunków *Nicotiana*, w tym 64 gatunki oraz formy autotetraploidalne i odmiany botaniczne, a także 780 odmian tytoniu szlachetnego (*Nicotiana tabacum* L.) i 83 odmiany machorki (*Nicotiana rustica* L.). Kolekcja zdeponowana jest w postaci nasion w przechowalni długoterminowej w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie (Czubacka, 2022), natomiast duplikaty przechowywane są w szafach nasiennych w temperaturze 4°C w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa - PIB w Puławach.

Kolekcje rodzaju *Nicotiana* są prowadzone również w kilku ośrodkach w Europie i na świecie. Należy do nich firma Bergerac Nasiona i Hodowla, powstała w miejsce historycznego Instytutu Tytoniowego w Bergerac we Francji ([www.bergeracsb.com](http://www.bergeracsb.com)), oraz dwa ośrodki w Niemczech. Pierwszy z nich, pod nazwą NiCoTa, jest zlokalizowany w Badenii Wirtembergii, a drugi to bank genów IPK w Gatersleben (Lewis, 2021). Amerykańska kolekcja gromadząca zasoby genowe rodzaju *Nicotiana* zlokalizowana jest w Stacji Badawczej w Oksfordzie w Północnej Karolinie, a dodatkowo mniejsze ilości nasion w formie duplikatów są przechowywane długoterminowo w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  w Narodowym Centrum Zasobów Genetycznych w Fort Collins w Colorado. Kolekcja amerykańska jest połączona z Krajowym Systemem Zasobów Genowych Roślin (NPGS, National Plant Germplasm System) i Siecią Informacyjną o Zasobach Genowych (GRIN, Genetic Resources Information Network), co pozwala na legalną wysyłkę nasion z odpowiednim certyfikatem fitosanitarnym (Lewis i Nicolson, 2007). Osobne miejsce zajmuje kolekcja *Nicotiana* zlokalizowana w Centrum Badań i Rozwoju Tytoniu na Uniwersytecie Kentucky (KTRDC, Kentucky Tobacco Research & Development Center) (Lewis, 2021). Publiczna kolekcja *Nicotiana* znajduje się również w Malawi i jest utrzymywana przez Fundusz Badań i Rozwoju Rolnictwa (ARET, Agriculture Research and Extension Trust). ARET jest odpowiedzialny za prowadzenie badań i świadczenie usług technicznych i rozszerzających w zakresie tytoniu (Lewis, 2021). Największa kolekcja *Nicotiana* znajduje się w Instytucie Badań nad Tytoniem (TRI, The Tobacco Research Institute) Chińskiej Akademii Nauk Rolniczych (CAAS, Chinese Academy of Agricultural Sciences) w Prowincji Shandong (Tobacco Research Institute of the Chinese, 2016). Poza kolekcjami, do których jest dostęp publiczny, istnieją także prywatne, gdzie wgląd do informacji o zgromadzonych obiektach jest ograniczony lub niemożliwy (Lewis, 2021).

Tytoń szlachetny (*Nicotiana tabacum*) jest gatunkiem posiadającym najwięcej odmian i form w całym rodzaju *Nicotiana*, a tym samym najliczniej reprezentowanym w gromadzonych kolekcjach. To również jedna z ważniejszych roślin przemysłowych, uprawiana w blisko 100 krajach świata i wykorzystywana do wyrobów tytoniowych (Berbec i Madej, 2012). Drugim niezmiernie ważnym zastosowaniem tytoniu jest wykorzystywanie go w tzw. rolnictwie molekularnym jako zielony bioreaktor do produkcji biofarmaceutyków. W ten sposób wytwarzane są przeciwciała, szczepionki, cytokiny oraz biopolimery i enzymy. Jest to możliwe dzięki temu, że opracowano bardzo wydajną transformację genetyczną tej rośliny oraz dlatego że posiada ona duży potencjał produkcji biomasy (Przybyś, 2012).



Gatunek *Nicotiana tabacum* jest naturalnym allotetraploidem ( $2n=4x=48$ ) powstałym w wyniku spontanicznego krzyżowania dwóch gatunków: *Nicotiana sylvestris* x *Nicotiana tomentosiformis* z pewnym udziałem genów należących do *N. otophora* (Kenton i in., 1993; Chase i in., 2003). Wyniki sekwencjonowania genomu chloroplastowego *N. tabacum* (Shinozaki i in., 1986), jak również genomu chloroplastowego *N. sylvestris* i *N. tomentosiformis* (Yukawa i in., 2006) wskazują, że stopień identyczności genomu chloroplastowego *N. tabacum* z *N. sylvestrii* wynosi 99,99%, a z *N. tomentosiformis* 98,54%. Na tej podstawie można potwierdzić, że źródłem genomu chloroplastowego *N. tabacum* jest *N. sylvestris* (Yukawa i in., 2006). Badania Blanda i in. (1985) pozwalają stwierdzić, że również genom mitochondrialny w *N. tabacum* pochodzi od *N. sylvestris*, choć w tym przypadku występuje niewielka rozbieżność ewolucyjna między tymi genomami.

Genom *Nicotiana tabacum* należy do największych w rodzinie Solanaceae (Bakaher, 2020). Z tego powodu pierwsza wersja mapy genetycznej o wysokiej rozdzielczości skonstruowanej przy użyciu około 300 markerów mikrosatelitarnych, została opublikowana dopiero w 2007 roku (Bindler i in., 2007), a następnie bardziej szczegółowa mapa zawierająca 2317 markerów mikrosatelitarnych powstała w 2011 roku (Bindler i in., 2011). Kolejna mapa genetyczna tytoniu oparta była o polimorfizm pojedynczych nukleotydów (SNP – Single-nucleotide polymorphism) (Xiao i in., 2015). Mapy SNP w znaczący sposób poprawiają ocenę różnorodności genetycznej tytoniu, analizy mapowania QTL (Quantitative Trait Loci) lub asocjacji, a także umożliwiają mapowanie większej ilości regionów genomowych. Są zatem powszechnie stosowanym narzędziem do tworzenia nowych odmian (Bakaher, 2020).

*Nicotiana tabacum* jest również uznawany za organizm modelowy w obrębie Solanaceae ze względu na dość krótki okres wzrostu i rozwoju, profil biochemiczny i łatwość modyfikacji (Gebhardt, 2016).

Uprawa tytoniu dla celów komercyjnych wiąże się z występowaniem wielu chorób, toteż problematyka ta zajmuje bardzo ważne miejsce w badaniach nad tym gatunkiem. Szczególnie dużo uwagi poświęca się badaniom związanym z odpornością na patogeny, tj. bakterie, grzyby i wirusy, które wywołują choroby i przez to są czynnikami zmniejszającymi jakość i ilość plonu. Istotne zagrożenie stanowią również owady, będące zarówno szkodnikami, jak i wektorami przenoszącymi choroby wirusowe.

Choroby bakteryjne tytoniu powodowane są głównie przez *Pseudomonas syringae* i *Pseudomonas angulata*. W celu ochrony roślin przed zakażeniem tymi bakteriami ważna jest przede wszystkim odpowiednia profilaktyka, szczególnie na etapie produkcji rozsady

poprzez stosowanie odkażonych nasion, wolnego od patogenów podłoża, jak również odkażanie narzędzi.

Bardzo szeroką grupę stanowią patogeny grzybowe tytoniu, do których należą: *Peronospora tabacina*, *Alternaria alternata*, *Cercospora nicotianae*, *Berkeleyomyces basicola* (dawniej *Thielaviopsis basicola*), *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* i *Sclerotinia sclerotiorum*. Najlepszym sposobem uniknięcia chorób grzybowych jest odpowiednia profilaktyka i agrotechnika, a w przypadku wystąpienia porażenia możliwe jest zastosowanie odpowiednich fungicydów.

Najważniejsze choroby wirusowe tytoniu w Polsce i na świecie to brunatna nekroza nerwów tytoniu, brunatna plamistość pomidora na tytoniu oraz mozaika tytoniu. Wirusy je powodujące różnią się od siebie znacznie pod wieloma względami m.in. sposobem infekowania roślin, objawami chorobowymi i sposobami ograniczania nasilenia choroby. Jednakże wspólnym problemem w walce z chorobami wirusowymi jest brak skutecznej ochrony chemicznej, która ogranicza się jedynie do zmniejszenia populacji wektora, ale nie zapobiega rozwojowi infekcji już istniejącej. W związku z tym istnieje konieczność prowadzenia prac hodowlanych w kierunku uzyskania odporności na choroby wirusowe (Doroszewska i in., 2013). Aby hodowla odpornościowa była skuteczna niezbędna jest dokładna wiedza na temat źródeł odporności jak też czynników sprawczych choroby.

Prowadzone prace badawcze dotyczyły trzech wirusów, które powodują największe zagrożenie dla uprawy tytoniu: wirusa Y ziemniaka (*Potato virus Y*, PVY), wirusa brązowej plamistości pomidora na tytoniu (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) i wirusa mozaiki tytoniu (*Tobacco mosaic virus*, TMV). W zależności od uwzględnionego w badaniach wirusa różnicowana była liczba obiektów oraz metodyka badań.

### 3. Hipoteza i cel badań

Hipoteza badawcza zakładała, że w obrębie zasobów genowych rodzaju *Nicotiana* występują obiekty posiadające odporność na choroby wirusowe tytoniu powodowane przez:

- wirus Y ziemniaka (*Potato virus Y*, PVY),
- wirus brązowej plamistości pomidora na tytoniu (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV),
- wirus mozaiki tytoniu (*Tobacco mosaic virus*, TMV).

Celem badań była ocena zasobów genowych rodzaju *Nicotiana* pod względem odporności na wymienione powyżej choroby wirusowe tytoniu.

Cele szczegółowe obejmowały ocenę tych źródeł odporności w zakresie wywoływanych objawów chorobowych po inokulacji, obecności wirusa w roślinie w badaniach immunoenzymatycznych i zróżnicowania genetycznego w badaniach z użyciem markerów molekularnych.

## 4. Przegląd literatury

### 4.1. Charakterystyka rodzaju *Nicotiana*

Rodzaj *Nicotiana* jest piątym pod względem wielkości rodzajem należącym do rodziny Solanaceae. W 2020 roku zaliczono do niego 82 gatunki (Knapp, 2020), ale obecnie liczba ta jest wyższa ze względu na odkrywanie nowych gatunków (Augsten i in., 2022; Chase i in., 2022; Chase i Christenhusz, 2021a; Chase i Christenhusz, 2021b; Chase i in., 2021a, Chase i in. 2021b; Chase i in., 2021c; Chase i in., 2021d; Chase i in., 2021e; Bally i in., 2021).

Pierwsze badania związane z rodzajem *Nicotiana* miały miejsce już w 1753 roku, kiedy to Linneusz opisał cztery gatunki: *N. glutinosa*, *N. tabacum*, *N. rustica* i *N. paniculata*. Później Lehman w 1818 roku dodał 21 gatunki i wyodrębnił rodzaj jako całość. Kolejnych 7 gatunków zostało dodanych przez Kurtha. Pierwszy podział systematyczny został utworzony przez Dona w 1838 roku i obejmował cztery sekcje, wyodrębnione na podstawie koloru i kształtu kwiatu (Knapp i in., 2004). Następnie Kostoff (1943) podzielił rodzaj *Nicotiana* na 8 sekcji i włączył do nich 47 gatunków. Na podstawie oceny morfologicznej i cytologicznej Goodspeed (1954) opracował systematykę, w której wyodrębnił trzy podrodzaje (*Tabacum*, *Rustica* i *Petunioides*) oraz 14 sekcji, do których należało 60 gatunków. Autor ten uważał, że rodzaj *Nicotiana* posiada dwóch przodków: pre-*Cestrum* i pre-*Petunia*, a podstawowa liczba chromosomów wynosi  $n=6$ . Powstawanie nowych gatunków *Nicotiana* związane było z procesem samorzutnego krzyżowania międzygatunkowego, a następnie podwojeniem liczby chromosomów mieszańca. Systematyka ta obowiązywała do 2004 roku. Przeprowadzone badania molekularne jądrowego (Chase i in., 2003) i plastydowego DNA (Clarkson i in., 2004) pozwoliły zweryfikować i nieco zmienić systematykę rodzaju *Nicotiana* (Knapp i in., 2004). Zmiany te dotyczyły rezygnacji z podziału na podrodzaje i pozostawienie jedynie sekcji, w obrębie których dokonano pewnych przeszerogowań. Likwidacji uległa sekcja

*Thyrsiflorae*, a należący do niej gatunek *N. thyrsiflora* włączono do sekcji *Undulatae*. Utworzono nową sekcję *Sylvestres* dla gatunku *N. sylvestris*. Gatunki należące do dwóch sekcji *Repandae* i *Nudicaulis* przypisano razem do sekcji *Repandae* ze względu na wspólnych przodków. Zmianie uległa nazwa kilku sekcji: *Genuinae* na *Nicotiana*, *Acuminatae* na *Petunioides* oraz *Bigelovianae* na *Polydicliae*, a także zmieniono nazwy dwóch gatunków: *Nicotiana trigonophylla* na *Nicotiana obtusifolia* oraz *Nicotiana bigelovii* na *Nicotiana quadrivalvis*. Ostatnia zmiana dotyczyła przeniesienia gatunku *Nicotiana glutinosa* z sekcji *Tomentosae* do sekcji *Undulatae*, a także gatunku *Nicotiana glauca* z sekcji *Paniculata* do sekcji *Noctiflorae*.

Rodzaj *Nicotiana* jest bardzo zróżnicowany pod względem morfologii, liczby chromosomów i rozmieszczenia geograficznego, a także różni się składem alkaloidowym i odpornością na choroby i szkodniki.

Gatunki rodzaju *Nicotiana* występują naturalnie na terenie Ameryki Północnej i Południowej, Australii i Nowej Zelandii oraz Afryki (ryc. 1). Jedynie *N. tabacum* i *N. rustica*, mimo że pochodzą z terenu Ameryki Południowej, ze względu na ich wykorzystanie występują na całym świecie (Goodspeed, 1954; Chase i in., 2003, Doroszewska i in., 2009).



Rycina 1. Naturalne występowanie gatunków z rodzaju *Nicotiana* (według systematyki Goodspeeda, 1954). Źródło: Doroszewska i in., 2009.

Krótką charakterystykę gatunków należących do poszczególnych sekcji według obowiązującej systematyki przedstawiona jest poniżej (Knapp i in., 2004; Doroszewska i in., 2009; Knapp, 2020).

Sekcja *Alatae* obejmuje 9 gatunków, które występują na terenie Ameryki Południowej. Liczba chromosomów wynosi  $2n=18$  (*N. alata*, *N. bonariensis*, *N. forgetiana*, *N. langsdorfii*, *N. mutabilis*) lub  $2n=20$  (*N. longiflora*, *N. plumbaginifolia*). Dla gatunku *N. azambujae* brak

jest informacji dotyczących liczby chromosomów. Również dla nowo odkrytego gatunku *Nicotiana gandarela* liczba chromosomów jest nieznana (Augsten i in, 2022). Gatunki z sekcji *Alatae* są to rośliny jednoroczne, o wysokości od 0,3 do 1,5 metra. W początkowej fazie wzrostu tworzą rozetę liściową, po czym liście dolne osiągają dość duże rozmiary, zaś górne są mniejsze, lancetowate. Ogonki liściowe są oskrzydłone. Kwiatostan przyjmuje formę wiechy lub rzekomego grona. Kwiaty otwierają się przeważnie wieczorem i są pachnące. U niektórych gatunków są samoniezgodne. Kolor kwiatów jest zróżnicowany: biały (*N. alata*, *N. bonariensis*), białolawendowy (*N. longiflora*, *N. plumbaginifolia*), zielonkawożółty (*N. langsdorfii*) i czerwono-fioletowy (*N. forgetiana*, *N. gandarela*). Natomiast kwiaty gatunku *N. mutabilis*, odkrytego i opisanego przez Stehmann i in. w 2002, mają zdolność do zmiany barwy od białej, poprzez różową aż do koloru fuksji.

Do sekcji *Nicotiana* należy tylko gatunek *Nicotiana tabacum*, który posiada  $2n=48$  chromosomów. Jest to roślina jednoroczna, osiągająca od 1 do 3 metrów wysokości. W obrębie tego gatunku występuje ogromna liczba odmian wykazujących różnice morfologiczne dotyczące kształtu i wielkości liści oraz koloru kwiatów.

Sekcja *Noctiflorae* zawiera gatunki posiadające  $2n=24$  chromosomy i występujące głównie na terenie Ameryki Południowej. Między poszczególnymi gatunkami występują znaczne różnice. *Nicotiana acaulis* i *N. ameghinoi* to niskie rośliny wieloletnie, o drobnych, lancetowatych liściach i kwiatach kremowobiałych lub żółtawobiałych. *Nicotiana noctiflora* i *N. petunioides* to raczej jednoroczne, samoniezgodne gatunki o lancetowatych liściach i białych kwiatach otwierających się wieczorem. Natomiast *N. glauca* to w warunkach naturalnych zdrewniały krzew, a nawet niewielkie drzewo o wysokości od 3 do 6 metrów. Występuje on nie tylko na terenie Ameryki Południowej, ale również Ameryki Środkowej, USA i Hawajów, a także w Australii, Afryce, Palestynie i Indiach. W niektórych krajach uznawana jest nawet za roślinę inwazyjną. Łodyga i liście są gładkie o zielonkawoniebieskim zabarwieniu, a kwiaty są koloru żółtego.

Sekcję *Paniculatae* reprezentuje 7 gatunków pochodzących z terenu Ameryki Południowej i mających  $2n=24$  chromosomy. Są to zarówno rośliny jednoroczne, jak i zdrewniałe wieloletnie krzewy o dość dużych, ogonkowych liściach, pokrytych włoskami. Kwiatostan przyjmuje głównie formę wiechy, a kwiaty są zielonkawożółte.

Osiem gatunków rosnących naturalnie głównie na terenie Ameryki Południowej, a także Ameryki Północnej oraz Meksyku należy do sekcji *Petunioides*. Są to gatunki jednoroczne o  $2n=24$  liczbie chromosomów. Liście dolne tworzą rozetę liściową. Kształt i wielkość liści oraz rodzaj kwiatostanu są zróżnicowane. Wszystkie gatunki z tej sekcji

posiadają białe kwiaty, a długość rurki kwiatowej jest różna. W przypadku większości z nich kwiaty otwierają się wieczorem.

*Nicotiana quadrivalvis* (dawniej *N. bigelovii*) oraz *N. clevelandii* to dwa gatunki o  $2n=48$  chromosomów należące do sekcji *Polydichiae* i występujące na terenie Stanów Zjednoczonych. Są to rośliny jednoroczne o białych kwiatach. Liście początkowo przyjmują formę rozety, zaś liście łodygowe są różnej wielkości, ogonkowe lub bez ogonków. Obydwa gatunki były uprawiane przez Indian jako tytoń do palenia i żucia.

Sekcja *Repandae* zawiera cztery gatunki występujące na terenie Stanów Zjednoczonych i Meksyku o liczbie chromosomów  $2n=48$ . Są to niewysokie rośliny jednoroczne o kwiatostanie w formie rzekomego grona lub wiechy. Liście dolne są dość duże, posiadają ogonek liściowy oskrzydłony zakończony uszkami otulającymi łodygę lub zbiegającymi po łodydze. Kwiaty są koloru białego, ale wielkość i długość rurki kwiatowej jest zróżnicowana. Z wyjątkiem *N. nudicaulis*, kwiaty pozostałych gatunków otwierają się wieczorem.

Jedynym przedstawicielem sekcji *Rusticae* jest gatunek *Nicotiana rustica*, pochodzący z Ameryki Południowej, posiadający  $2n=48$  chromosomów. Był to pierwszy gatunek tytoniu stosowany do palenia, wciągania i żucia. W obrębie *N. rustica* występuje wiele odmian różniących się morfologicznie, ale cechą wspólną jest to, że jest to roślina jednoroczna o dość dużych, ogonkowych liściach i zielonożółtych kwiatach.

Sekcja *Suaveolentes* to najliczniejsza sekcja obejmująca obecnie około 35 gatunków. Prawie wszystkie gatunki tej sekcji występują na terenie Australii i wysp na Pacyfiku. Jedynie gatunek *N. africana* został odnaleziony w Namibii w Afryce (Merxmüller i Butler, 1975). Liczba chromosomów w tej sekcji jest zróżnicowana i wynosi od  $2n=32$ , przez 36, 38, 40, 42, 44 do 48. Występują również różnice morfologiczne dotyczące wysokości i pokroju roślin, kwiatostanu oraz kształtu i wielkości liści i kwiatów. Cechą wspólną dla wszystkich gatunków z tej grupy są natomiast białe kwiaty, które w większości przypadków otwierają się wieczorem i są pachnące. Z wyjątkiem *N. africana*, *N. fragrans* i *N. gossei*, które mogą przyjąć formę wieloletnich krzewów, wszystkie pozostałe gatunki są to jednoroczne lub krótkożyjące rośliny zielne. Liczba gatunków w obrębie sekcji *Suaveolentes* wzrastała na przestrzeni lat ze względu na odkrywanie i opisywanie nowych gatunków (Goodspeed, 1954; Burbidge, 1960; Clarkson i Symon, 1991; Symon i Kenneally, 1994; Symon, 1998; Symon i Lepšchi, 2007; Chase i in., 2018a, Chase i in., 2018b, Chase i in., 2018c; Chase i Christenhusz 2018a, Chase i Christenhusz 2018b, Chase i Christenhusz, 2021a; Chase i Christenhusz, 2021b; Chase i in., 2021a, Chase i in., 2021b, Chase i in., 2021c; Chase i in.,

2021e; Chase i in., 2021f; Bally in., 2021; Chase i in., 2022). Duża liczba gatunków w tej sekcji jest według Goodspeeda (1954) wynikiem kilku zdarzeń poliploidyzacji. Natomiast dotychczasowe wyniki filogenetyczne sugerują, że to jedno zdarzenie dało początek grupie, a następnie miała miejsce rozległa specjacja na poziomie poliploidalnym (Clarkson i in., 2017).

Pojedynczy gatunek *N. sylvestris*, o liczbie chromosomów równej  $2n=24$ , jest reprezentantem sekcji *Sylvestres*. Pochodzi on z terenów Ameryki Południowej, gdzie rośnie jako wieloletnia roślina zielna osiągająca wysokość od 1 do 1,5 metra. Liście ma duże, siedzące, z zaznaczonymi uszkami, a kwiaty białe z długą rurką kwiatową, skierowane do dołu i lekko pachnące.

Do sekcji *Tomentosae* należy pięć gatunków posiadających  $2n=24$  chromosomy. Występują one na terenie Ameryki Południowej, gdzie tworzą zdrewniałe, lepkie krzewy o wysokości od 1 do ponad 5 metrów. Liście tych gatunków są duże, siedzące z uszkami lub oskrzydłone i zbiegające po łodydze. Kwiaty przyjmują kształt kielicha, gdzie rurka kwiatowa jest żółtozielona, a łatki różowe lub czerwone.

Dwa podobne do siebie gatunki: *N. obtusifolia* (dawniej *N. trigonophylla*) i *N. palmerii*, są przypisane do sekcji *Trigonophyllae*. Są to jednoroczne lub rzadziej wieloletnie rośliny zielne o liczbie chromosomów  $2n=24$  i pochodzące z terenu Stanów Zjednoczonych i Meksyku. Posiadają niezbyt duże liście, często siedzące z zaznaczonym uszkiem obejmującym łodygę. Kwiatostan przyjmuje postać rzekomego grona, a kwiaty są białe z zielonkawokremową rurką kwiatową, skierowane przeważnie do dołu.

Ostatnia prezentowana sekcja *Undulatae* obejmuje pięć gatunków rosnących naturalnie w Ameryce Południowej. Jest to bardzo zróżnicowana morfologicznie grupa pod kątem pokroju, kształtu i wielkości liści oraz kwiatów, a także koloru kwiatów. Ponadto są to zarówno rośliny jednoroczne, jak i wieloletnie krzewy. Cztery gatunki z tej sekcji mają  $2n=24$  chromosomy, a jeden  $2n=48$ . Mimo szeregu różnic analiza molekularna wskazuje na podobieństwo genetyczne tych gatunków.

Przedstawiona powyżej charakterystyka rodzaju *Nicotiana* ukazuje ogromne zróżnicowanie pomiędzy gatunkami, zarówno pod względem morfologii i cytogenetyki, jak również ich zastosowania.

Podstawowym gatunkiem służącym do produkcji wyrobów tytoniowych jest *Nicotiana tabacum*. Na mniejszą skalę do tego celu służą również inne gatunki: *N. rustica*, *N. repanda*, *N. attenuata* i *N. quadrivalvis*. Niektóre dzikie gatunki tytoniu (*N. alata*, *N. sylvestris*, *N. langsdorfii*, *N. forgetiana* i *N. sanderae*) są uprawiane jako rośliny ozdobne lub znajdują zastosowanie w przemyśle (*N. rustica* i *N. glauca*) (Lester i Hawkes, 2001).

W obrębie rodzaju *Nicotiana* występują zarówno gatunki diploidalne, jak i poliploidalne. Według systematyki zaproponowanej przez Knapp i in. (2004) wyróżniamy siedem sekcji, w których gatunki są diploidalne (n=12) oraz cztery sekcje, w których gatunki są allotetraploidalne (n=24). Osobną grupę stanowią również gatunki aneuploidalne, które znajdziemy w sekcji *Alatae* (n=9; n=10) oraz sekcji *Suaveolentes* (n=16-22). Tak duża różnorodność sprawia, że stanowią one bazę do wielu badań, pozwalających lepiej zrozumieć proces poliploidyzacji i ewolucji. Dużym osiągnięciem było zsekwencjonowanie genomów niektórych gatunków *Nicotiana*: *N. benthamiana* (Bombarely i in., 2012; Naim i in., 2012), *N. sylvestris* i *N. tomentosiformis* (Sierro i in., 2013a), *N. tabacum* (odmiany: K326, TN90, Basma Xanthi) (Edwards i in., 2017; Sierro i in., 2014), *N. otophora* (Sierro i in. 2014), *N. attenuata* i *N. obtusifolia* (Xu i in., 2017), *N. glauca* (Khafizova i in., 2018), a także *N. rustica*, *N. undulata*, *N. paniculata* i *N. knightiana* (Sierro i in., 2018).

Na podstawie badań cytogenetycznych, w tym genomowej hybrydyzacji in situ (GISH) oraz danych dotyczących sekwencji molekularnych, ustalono potencjalne gatunki rodzicielskie dla niektórych allopolyploidów. Najwcześniej określono potencjalnych przodków *Nicotiana tabacum*, gdzie *N. sylvestris* stanowi genom mateczny, a *N. tomentosiformis* genom ojcowski (ryc. 2) (Kenton i in., 1993). Drugi gatunek o znaczeniu przemysłowym, czyli *Nicotiana rustica* powstał w wyniku krzyżowania *N. paniculata* i *N. undulata* (Lim i in., 2004). Ponadto określono, że rodzicem matecznym dla *N. arentsii* jest *N. undulata*, a rodzicem ojcowskim *N. wigandioides* (Lim i in., 2004). Wykazano również, że dla gatunków z sekcji *Suaveolentes* rodzicem ojcowskim był członek sekcji *Sylvestres*, zaś rodzicem matecznym mógł być hipotetyczny gatunek diploidalny, zawierający allele pochodzące zarówno z sekcji *Petunioides*, jak i *Noctiflorae* (Kelly i in., 2012).





Rycina 2. *Nicotiana sylvestris* (po lewej) - rodzic maticzny oraz *Nicotiana tomentosiformis* (po prawej) - rodzic ojcowski gatunku *Nicotiana tabacum* (Źródło: Doroszewska i in., 2009)

Pod względem biochemicznym głównymi alkaloidami gatunków z rodzaju *Nicotiana* są nikotyna i nornikotyna, a także w mniejszym stopniu anabazyna i anatabina (Dewey i Xie, 2013; Eich, 2008). Badania 64 gatunków *Nicotiana* wykazały, że dla 35 gatunków, w tym *N. tabacum* i jego gatunku rodzicielskiego *N. sylvestris*, nikotyna jest dominującym metabolitem, natomiast nornikotyna jest dominującym alkaloidem dla 25 gatunków, w tym *N. tomentosiformis* (Sierro i in. 2013). U czterech gatunków (*N. glauca*, *N. noctiflora*, *N. petunioides* i *N. acaulis*) głównym alkaloidem jest anatabina (Sisson i Severson, 1990). Nikotyna jest syntetyzowana w korzeniach i transportowana ksylemem do pozostałych części rośliny. Biosynteza nikotyny jest warunkowana przez dwa geny *NIC1* i *NIC2* (Shiji i in.,

2010). Nornikotyna powstaje z nikotyny w procesie konwersji przy udziale odpowiednich enzymów. Proces ten jest kontrolowany przez trzy geny: *CYP82E4*, *CYP82E5* i *CYP82E10* (Lewis i in., 2010). Obecność nikotyny w liściach tytoniu jest cechą korzystną, a jej ilość jest zróżnicowana i zależy głównie od odmiany, ale także od czynników środowiskowych i agrotechnicznych (Trojak-Goluch i Kawka-Lipińska, 2022). Natomiast wysoki udział nornikotyny jest niepożądany ze względu na jej zdolność do przekształcenia w N-nitrozonornikotynę (NNN), należącą do grupy nitrozoamin tytoniowych (TSNA, ang. *tobacco-specific nitrosamines*), które mają działanie rakotwórcze (Hecht, 2003).

Gatunki z rodzaju *Nicotiana* są także cennym obiektem badawczym (Lewis, 2020). W literaturze do 2019 roku można znaleźć odniesienia do 445 międzygatunkowych kombinacji mieszańcowych w obrębie rodzaju *Nicotiana*. Obejmują one zarówno krzyżówki z *N. tabacum*, jak i z innym siostrzanym gatunkiem *Nicotiana* (Berbec i Doroszevska, 2020). Są również wykorzystywane jako organizmy modelowe (Chase i in., 2021d; Brokmöller i in., 2017; Navarro-Quezada i in., 2020).

Jednym z najczęściej spotykanych i cytowanych na całym świecie roślin modelowych jest *Nicotiana benthamiana* (Chase i in., 2021d). Gatunek ten występuje w północnej części Australii i do niedawna uznawany był za jeden z najbardziej rozpowszechnionych gatunków w sekcji *Suaveolentes* (Chase i Christenhusz, 2018c). Pierwszy okaz *N. benthamiana* został zebrany w 1936 roku przez Johna Clelanda z Instytutu w Adelajdzie w czasie ekspedycji na północno-zachodnie wybrzeże Australii (Wylie i Li, 2022). Wykonane w ostatnim czasie szczegółowe badania wykorzystujące filogenetyczne i populacyjne analizy genetyczne wykazały istnienie pięciu odrębnych gatunków wykazujących różnice morfologiczne i geograficzne w obrębie populacji uznawanej za *N. benthamiana* (Cauz-Santos i in., 2022). Należą do nich *N. bilybara*, *N. candelabra*, *N. rupestris*, *N. scopularum* oraz właściwy *N. benthamiana* (Chase i in., 2022). W obrębie obiektów *N. benthamiana* wyodrębniono szczep LAB, który znalazł szerokie zastosowanie w badaniach nad interakcją roślina/wirus, ze względu na jego wyjątkową podatność na szeroki zakres wirusów roślinnych. Gatunek ten jest też stosunkowo łatwy w manipulacji *in vitro* oraz stanowi dobry nośnik dla ekspresji transgenów i rekombinowanych białek oraz do eksperymentów z wykorzystaniem CRISPR-Cas9 i innych systemów edycji genów. Z tego powodu jest również wykorzystywany do produkcji farmaceutyków (Pombo i in., 2020; Chase i in., 2021d; Wylie i Li, 2022). Stwierdzono, że szczep LAB posiada mutację w postaci insercji o długości 72 nukleotydów w genie polimerazy RNA zależnej od RNA (gen *NbRdr1m*), co czyni go niefunkcyjnym i powoduje podatność na wirusy. Istnieją jednak dzikie formy

*N. benthamiana*, które zawierają nienaruszoną, funkcjonalną kopię genu *NbRdr1*. Występują również różnice morfologiczne pomiędzy szczepem LAB, którego rośliny są niższe, mają cieńsze i bardziej elastyczne łodygi i ogonki liściowe, mniejsze i bardziej miękkie liście o jaśniejszym odcieniu zieleni oraz mniejsze kwiaty, a formą dziką *N. benthamiana*. Co więcej, nasiona formy LAB są większe i nie potrzebują okresu spoczynku, przez co możliwe jest ich szybsze rozmnażanie (Wylie i Li, 2022). Wnikliwe badania tego obiektu oraz zachowana korespondencja, jaka była prowadzona między ośrodkami naukowymi, pozwoliły stwierdzić, że szczep LAB pochodzi z pierwszego zbioru Clelanda. Zebrane przez niego nasiona zostały wysłane do Thomasa Goodspeeda, który prowadził szerokie badania nad rodzajem *Nicotiana*, a następnie trafiły do innych laboratoriów na całym świecie (Chase i in., 2021d; Wylie i Li, 2022).

Gatunkiem modelowym, który służy do badań nad ekologicznymi interakcjami występującymi w przyrodzie, jest również *Nicotiana attenuata*. Jest to gatunek diploidalny występujący na terenie Stanów Zjednoczonych. Roślina ta przystosowała się do niszy ekologicznej zdefiniowanej przez środowisko po pożarze, gdzie gleby są zwykle bogate w azot, a stesy biotyczne są bardzo dynamiczne. *Nicotiana attenuata* wykazuje dużą biochemiczną i fenotypową plastyczność, która pozwala jej radzić sobie ze środowiskowymi wyzwaniami związanymi z zapyłaczami, mikroorganizmami oraz z roślinożernością owadów. Gatunek ten był przedmiotem szczegółowych badań genomicznych, transkryptomicznych i metabolomicznych (Brokmöller i in., 2017; Navarro-Quezada i in., 2020).

Ważnym aspektem wykorzystania dzikich gatunków *Nicotiana* jest zastosowanie ich cytoplazmy, która pozwala na uzyskanie cytoplazmatycznej męskiej sterylności (cms). W wyniku braku współdziałania pomiędzy czynnikami genetycznymi jądra i cytoplazmy zaburzony jest rozwój męskich organów generatywnych i mikrosporogenezy. Uzyskane formy cytoplazmatycznie męskosterylne pozwalają na kontrolowane uzyskanie mieszańców F<sub>1</sub>, przez co chronią prawa autorskie hodowcy. Najczęściej wykorzystywanym źródłem cms są *N. suaveolens* i *N. glauca* (Depta i in., 2012; Lewis, 2020).

Gatunki *Nicotiana* posiadają odporność na szereg chorób i szkodników (Doroszevska i in., 2009). Niestety w wielu przypadkach występują duże trudności w przeniesieniu genów odporności ze względu na istniejące bariery krzyżowalności, które obejmują niezgodność krzyżówkową, śmiertelność i bezpłodność mieszańców (Depta i in., 2012). Ponadto odporność gatunków *Nicotiana* często warunkowana jest wielogenowo. Krzyżowanie międzygatunkowe wiąże się również z losową introgresją genów dawcy do genomu biorcy, co negatywnie wpływa na cechy biologiczne i agronomiczne uzyskanej odmiany (Berbec

i Doroszevska, 2020). Niemniej jednak dzikie gatunki tytoniu stanowią cenne, często jedyne źródło odporności na patogeny, a rozwój nowych technik pozwala na przełamywanie zaistniałych trudności w procesie hodowlanym.

## **4.2. Główne patogeny powodujące choroby tytoniu**

### **4.2.1. Wirus Y ziemniaka (*Potato virus Y*, PVY)**

Bardzo ważnym patogenem powodującym duże straty ekonomiczne w uprawie tytoniu jest wirus Y ziemniaka należący do rodzaju *Potyvirus* i rodziny *Potyviridae*. Genom PVY zbudowany jest z pojedynczej, sensownej nici RNA o długości 9700 nukleotydów. Koniec 5' cząsteczki RNA zawiera kowalencyjnie związane białko VPg (ang. Veinal Protein genome linked), zaś koniec 3' jest poliadenylowany. Całość wirusa otoczona jest białkowym płaszczem CP (ang. Coat Protein) (Robaglia i in., 1989; Thole i in., 1993). PVY poraża wiele roślin uprawnych z rodziny Solanaceae, w szczególności ziemniaka, tytoń, pomidora i paprykę oraz niektóre dzikie gatunki roślin. Na tytoniu PVY powoduje brunatną nekrozę nerwów, której widocznym objawem są początkowo przejaśnienia, a następnie nekrozy nerwów, co ogranicza transport wody i soli mineralnych do tkanek liści oraz plamy chlorotyczne blaszki liściowej, które zmniejszają powierzchnię i zdolność asymilacyjną oraz wymianę gazową. Skutkuje to zahamowaniem wzrostu roślin, a niekiedy ich całkowitym zamieraniem (Scholthof i in., 2011; Wen i in., 1999).

Klasyfikacja PVY oparta jest na cechach biologicznych, serologicznych i molekularnych. Wyodrębniono trzy główne grupy tego wirusa. Grupa pierwsza obejmuje szczep PVY<sup>O</sup>, który występuje powszechnie i powoduje głównie mozaikowe przebarwienia, zarówno u większości odmian ziemniaka, jak i w tytoniu (Hane i Hamm, 1999). Druga grupa to szczep PVY<sup>C</sup>, który powoduje smugowatość u odmian ziemniaka posiadających gen *Nc* i nienekrotyczne objawy na tytoniu (Doroszevska, 2004). Ostatnią grupę stanowi szczep PVY<sup>N</sup>, który wywołuje objawy nekrotyczne na tytoniu i zróżnicowane objawy na ziemniaku. Z tego powodu podzielono go na dwie podgrupy: PVY<sup>NW</sup> i PVY<sup>NTN</sup>. Izolaty PVY<sup>NW</sup> powodują słabe objawy mozaiki na liściach ziemniaka, a izolaty PVY<sup>NTN</sup> mogą wywoływać nekrozę bulw (Chrzanowska, 1994; Le Romancer i in., 1994). Odróżnienie tych podgrup izolatów jest możliwe przy użyciu dwóch typów przeciwciał produkowanych przez firmę Bioreba (Gugerli i Fries, 1983). Ważną cechą PVY jest duża zmienność będąca skutkiem mutacji punktowych i rekombinacji między izolatami (Drake, 1993; Przybyś i in., 2013).

Należy podkreślić, że izolaty PVY<sup>N</sup> mają zdolność do przełamania istniejących źródeł odporności, co jest efektem mutacji w pozycji 105, 101 lub 108 białka VPg wirusa (Masuta i in., 1999; Przybyś, 2013; Janzac i in., 2014). Ponadto, PVY przenoszony jest przez mszyce w sposób nietrwały (Crosslin, 2013), uniemożliwiający skuteczną ochronę chemiczną.

Najlepszą metodą ograniczenia występowania PVY jest uprawa form odpornych. W obrębie odmian uprawnych *Nicotiana tabacum* odporność na PVY warunkowana jest pojedynczym, recesywnym genem *va* powstałym w wyniku delekcji w genie podatności *Va* zlokalizowanym na chromosomie 21 (Julio i in., 2015). Infekcja tytoniu powodowana przez PVY jest możliwa, gdy produkt genu *Va*, którym jest eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4F (eIF4E), wejdzie w interakcję z wirusowym białkiem VPg (Wittmann in., 1997; Robaglia i Caranta, 2006; Długe i in., 2018). Po raz pierwszy delekcję w obrębie genu *Va* uzyskano wskutek mutagenyzy promieniami X u podatnej odmiany Virgin A (Koelle, 1958), a następnie przeniesiono do innych odmian tytoniu na drodze hodowli. Badania molekularne przy pomocy markerów RAPD wykazały, że delekcja w odmianie VAM (Virgin A Mutant) ma wielkość 1Mbp (Noguchi i in., 1999). Trwałość odporności typu *va* zależy od typu mutacji w obrębie genu *eIF4E-1*, pochodzącego od *N. sylvestris* oraz w wyniku działania dodatkowych genów (Takakura i in., 2018; Michel i in., 2019).

Obecnie odporność warunkowaną recesywnym genem *va* posiada większość odmian uprawianych komercyjnie, a to sprawia, że wzrasta liczba zjadliwych izolatów PVY, szczególnie z grupy PVY<sup>NTN</sup>, które przełamują tę odporność (Lacroix i in., 2010; Lacroix i in., 2011; Verrier i Doroszewska, 2018). W obrębie odmian uprawnych *N. tabacum* występuje także gen *NiTPN1* odpowiedzialny za tolerancję (Michel i in., 2018).

Według niektórych danych literaturowych odporność na PVY posiadają *N. raimondii*, *N. knightiana*, *N. glauca*, *N. thyrsoiflora*, *N. benavidesii*, *N. miersii*, *N. noctiflora*, *N. noctiflora*, *N. tomentosa*, *N. tomentosiformis*, *N. wigandioides* i *N. paniculata* (Sievert, 1972; Głazewska, 1977). Brak jest jednak w tych publikacjach pełnej informacji o izolacie PVY użytym do zakażenia, jak również stosowane wówczas metody biologiczne do identyfikacji wirusa w roślinie były zdecydowanie mniej czułe niż obecne. Immunię na wszystkie zastosowane izolaty PVY wykazał gatunek *N. africana* (ryc.3) (Lucas i in., 1980; Doroszewska i Chrzanowska, 2001; Doroszewska, 2004; Doroszewska i Czubacka, 2008). Z tego powodu został on włączony do prac hodowlanych w kierunku uzyskania odporności na PVY (Wersmann, 1992; Lewis, 2005; Lewis, 2007; Doroszewska 2010; Depta i Doroszewska, 2019).



Rycina 3. *Nicotiana africana* – gatunek posiadający odporność na PVY (Źródło: Doroszevska i in., 2009)

Ze względu na duże ekonomiczne straty spowodowane wirusem Y ziemniaka konieczne jest poszukiwanie i identyfikacja zarówno w obrębie odmian tytoniu, jak również dzikich gatunków *Nicotiana* genów odporności na tego patogena. Prace wymagają uwzględnienia izolatów PVY o zróżnicowanej zjadliwości oraz metod serologicznych do potwierdzenia obecności lub braku wirusa w tkance roślinnej.

#### 4.2.2. Wirus brązowej plamistości pomidora na tytoniu (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)

Drugim niezmiernie ważnym patogenem, który poraża tytoń, jak również inne gatunki należące do 85 rodzin botanicznych, jest wirus brązowej plamistości pomidora na tytoniu, znany również pod nazwą *Lycopersicum virus 3* (Parella i in., 2003). Należy on do rodzaju *Orthotospovirus* i rodziny *Tospoviridae* (Francki i in., 1991; Wijkamp i in., 1993; Adams i in., 2017). Jest przenoszony przez wciornastki (Jones, 2005), w tym wciornastka tytoniowca (*Thrips tabaci*) z sokiem chorych roślin, przy czym wciornastki w stadium larwalnym jedynie pobierają wirusa z rośliny, a dopiero dorosłe zainfekowane osobniki po prezimowaniu, wiosną powodują infekcję tytoniu. Porażenie może nastąpić na każdym etapie rozwoju tytoniu, ale najbardziej narażone są rośliny młode, co może skutkować likwidacją całej plantacji. Ochrona tytoniu przed TSWV polega na chemicznym zwalczaniu tego wektora i powinna być prowadzona w ciągu sezonu wegetacyjnego, jak również po zbiorach i przed wysadzeniem roślin w polu (Doroszewska i in., 2013). Wszystkie odmiany komercyjne tytoniu uprawiane w Polsce i na świecie są podatne na tę wirozę. Najbardziej charakterystyczne objawy porażenia przez TSWV obejmują chlorotyczne i nekrotyczne plamy oraz przejaśnienia nerwów, które występują często po jednej stronie nerwu głównego, a także zahamowanie wzrostu roślin i charakterystyczne wygięcie wierzchołka pod kątem 45° (Mumford i in., 1996).

Gatunkiem odpornym na TSWV jest *Nicotiana glauca* (ryc. 4) (Jankowski, 1980), który wykazuje reakcję nadwrażliwości w postaci nekrotycznych plam na dolnych liściach. Uniemożliwia to przedostanie się wirusa do wyższych partii rośliny. Jednakże prace hodowlane z tym gatunkiem są bardzo trudne i nie przynoszą pożądanych efektów. Transfer genu odporności od *N. glauca* do odmian tytoniu uprawnego Polalta i Wiktoria był przedmiotem pracy Gajosa (1987, 1993). Jednakże uzyskane formy odporne charakteryzowały się słabymi cechami jakościowymi. Dane literaturowe wskazywały na istnienie innych dzikich gatunków tytoniu posiadających odporność na TSWV, ale metody określania tej odporności budziły wątpliwości (Ivancheva-Gabrovska, 1978; Jankowski, 1980; Kovalenko i in., 1987; Palakarcheva i Yancheva, 1989; Laskowska i in., 2013). Ze względu na dużą szkodliwość wirusa i konieczność kontynuowania hodowli odpornościowej w tym kierunku niezmiernie istotne było przebadanie obiektów *Nicotiana* pod względem odporności na TSWV w połączeniu z wykorzystaniem SCAR markerów związanych z odpornością i opracowanych przez Moona i Nicholsona (2007).



Rycina 4. *Nicotiana alata* – gatunek posiadający odporność na TSWV (Źródło: Doroszewska i in., 2009)

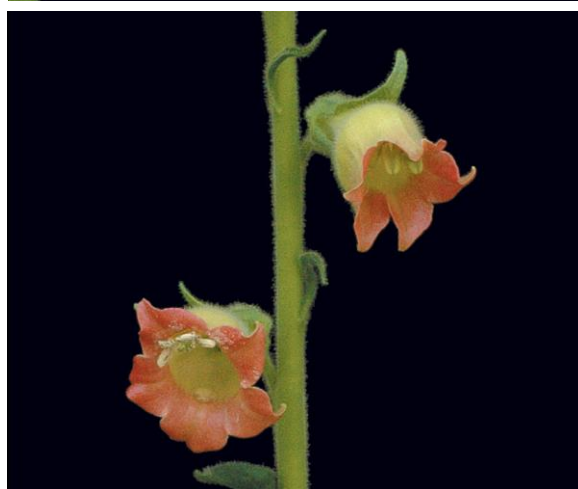
#### 4.2.3. Wirus mozaiki tytoniu (*Tobacco mosaic virus, TMV*)

Trzecim wirusem stanowiącym duże zagrożenie dla uprawy tytoniu jest wirus mozaiki tytoniu. Należy on do rodzaju *Tobamovirus* i zbudowany jest z pojedynczej nici RNA o sensownej polarności i długości 6395 nukleotydów (Goelet i in., 1982). Dodatkowo jest bardzo termostabilny i może przetrwać w suchym materiale nawet 50 lat. Wirus jest wysoce patogeniczny i wywołuje głównie objawy silnej mozaiki, ale mogą wystąpić również nekrozy, zahamowanie wzrostu, zwijanie liści i żółknięcie tkanek roślinnych. Objawy zależą od wieku zakażonej rośliny, jej genotypu, szczepu wirusa i warunków środowiskowych. Porażenie przez TMV powoduje obniżenie plonu i pogorszenie jakości surowca (Scholthof, 2000; Knapp i Lewandowski, 2001). TMV występuje na całym świecie i jest przenoszony w sposób mechaniczny, więc ochrona chemiczna jest zupełnie niemożliwa. Z tego powodu konieczne są prace hodowlane w kierunku uzyskania odmian odpornych.

W obrębie *Nicotiana tabacum* odporność na TMV posiada odmiana Ambalema. Jednakże jest ona warunkowana przez dwa recesywne allele i ma postać tolerancji tzn. wirus



jest obecny w roślinie mimo braku objawów chorobowych. Zmiany mozaikowe są natomiast widoczne w temperaturze powyżej 28°C (Clayton i in., 1938). Według danych literaturowych gatunkiem odpornym na TMV jest *Nicotiana glutinosa* (ryc. 5). Po raz pierwszy gen odporności na TMV pochodzący od *N. glutinosa* został przeniesiony do *N. tabacum* odmiany Samsun w 1938 roku (Holmes, 1938). Odporność warunkowana jest genem *N* i przyjmuje formę nadwrażliwości (Gwynn, 1977). Została dalej przeniesiona na drodze hodowli do odmian uprawnych tytoniu, ale w przypadku odmian w typie Virginia wiązało się to z negatywnym wpływem na fizyczne i chemiczne cechy liści (Lewis i in., 2005). Co więcej, jej skuteczność jest przełamywana w warunkach wysokiej temperatury powietrza, co w ostatnich latach zdarza się coraz częściej (White i Sugars, 1996). Do gatunków z rodzaju *Nicotiana* wymienianych jako źródło odporności na TMV należą *N. repanda*, *N. gossei*, *N. langsdorfii*, *N. rustica* (Valleau, 1952; Gwynn, 1977, Yuan i in., 2015) oraz *N. benthamiana*, *N. maritima*, *N. sanderae*, *N. velutina*, *N. acuminata*, *N. goodspeedii*, *N. forgetiana*, *N. nesophila* i *N. stoctonii* (Van Dijk i Cuperus, 1989; Yuan i in., 2015). Ze względu na niepełne dane dotyczące zastosowanych szczepów TMV oraz warunków przeprowadzonych testów, a także brak badań molekularnych, podjęto szczegółowe badania w tym zakresie.



Rycina 5. *Nicotiana glutinosa* – gatunek posiadający odporność na TMV (Źródło: Doroszewska i in., 2009)

## 5. Materiał i metody

### 5.1. Materiał badawczy

W badaniach uwzględniono dzikie gatunki *Nicotiana* oraz odmiany *Nicotiana tabacum* i *Nicotiana rustica* zgromadzone w kolekcji Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Liczba badanych obiektów różniła się w zależności od podejmowanych prac badawczych i została przedstawiona w Tabeli 1. Jako obiekt traktowany jest gatunek, odmiana oraz ustabilizowana linia hodowlana, a także formy tetraploidalne niektórych gatunków i odmian. Poszczególne obiekty posiadają własne numery akcesyjne. Ponad 60 gatunków oraz liczne odmiany, formy i populacje obiektów należących do rodzaju *Nicotiana* zostało przebadanych pod kątem odporności na trzy najbardziej znaczące wirusy. Szczegółowe informacje dotyczące badanych obiektów znajdują się w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską [1 - Doroszevska i Depta, 2011; 2 - Depta i in., 2020; 3 - Depta i in., 2021; 4 - Laskowska i in., 2013; 5 - Depta i in., 2018].

Tabela 1. Liczba obiektów poddanych badaniom odpornościowym na trzy najważniejsze choroby wirusowe

Wirus	Liczba obiektów <i>Nicotiana</i> badanych w kierunku odporności na poszczególne wirusy
PVY	126
TSWV	99
TMV	73

Opracowanie własne na podstawie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Badania odpornościowe prowadzono z wykorzystaniem izolatów poszczególnych wirusów. W przypadku PVY zastosowano 11 izolatów PVY należących do dwóch grup: PVY<sup>NW</sup> i PVY<sup>NTN</sup>, o zróżnicowanej zdolności do przełamania odporności typu *va* (tab. 2), co było podstawą określenia poszczególnych typów izolatów. Jako izolat słaby określano izolat, który nie przełamywał odporności typu *va* w odmianach VAM, Wiślica i V. SCR oraz był niewykrywalny przez monoklonalne przeciwciała przeciwko szczepowi nekrotycznemu i należy do grupy izolatów PVY<sup>NW</sup>. Jako izolat średni określano izolat, który nie przełamywał odporności typu *va* w odmianie VAM, ale porażał odmiany Wiślica i V. SCR, był niewykrywalny przez monoklonalne przeciwciała przeciwko szczepowi nekrotycznemu i należy do grupy izolatów PVY<sup>NW</sup>. Natomiast izolat silny to taki, który przełamywał odporność typu *va* u odmian VAM, Wiślica i V. SCR, był wykrywalny przez dwa typy przeciwciał i należy do grupy izolatów PVY<sup>NTN</sup>. Szczegółowe informacje dotyczące izolatów

znajdują się w publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej i dotyczących odporności obiektów *Nicotiana* na PVY (Doroszevska i Depta, 2011; Depta i in., 2020).

Izolat TSWV pochodził z plantacji produkcyjnej tytoniu z roślin wykazujących typowe objawy porażenia tym wirusem, a jego status serologiczny został określony za pomocą testów DAS-ELISA. Inokulum TMV stanowił czysty izolat wirusa mozaiki tytoniu o symbolu PV-0107 zakupiony w Leibniz-Institute DSMZ w Niemczech.

Tabela 2. Izolaty PVY użyte do oceny odporności obiektów *Nicotiana*

Nazwa izolatu	Zdolność do przełamania odporności typu <i>va</i>	Wykrywalność przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciw serotypowi nekrotycznemu (MoAbs anti YN, Bioreba).	Serotyp	Artykuł
PVY <sup>NW</sup> (-)	-	-	PVY <sup>NW</sup>	Doroszevska i Depta, 2011
IUNG 23	-	-	PVY <sup>NW</sup>	Depta i in., 2020
IUNG 17	-	-	PVY <sup>NW</sup>	Depta i in., 2020
IUNG21	-	-	PVY <sup>NW</sup>	Depta i in., 2021
PVY <sup>NW</sup> (+)	+	-	PVY <sup>NW</sup>	Doroszevska i Depta, 2011
IUNG 22	+	-	PVY <sup>NW</sup>	Depta i in., 2020
PVY <sup>NZ</sup>		+		Doroszevska i Depta, 2011
PVY <sup>NTN</sup> Pol(-)	-	+	PVY <sup>NTN</sup>	Doroszevska i Depta, 2011
PVY <sup>NTN</sup> Pol(+)	+	+	PVY <sup>NTN</sup>	Doroszevska i Depta, 2011
PVY <sup>NTN</sup> Ge(+)	+	+	PVY <sup>NTN</sup>	Doroszevska i Depta, 2011
IUNG 20	+	+	PVY <sup>NTN</sup>	Depta i in., 2020; Depta i in., 2021

Opracowanie własne na podstawie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

## 5.2. Metody badawcze

### 5.2.1. Testy odpornościowe

Celem badań biologicznych była ocena stopnia odporności zastosowanych obiektów na PVY, TSWV oraz TMV. Inokulacje prowadzono, gdy rośliny znajdowały się w stadium 5-6 liści. Rodzaj izolatu oraz sposób jego przygotowania i zakażenia był zależny od użytego wirusa.

#### 5.2.1.1. Inokulacja wirusem PVY

Źródłem inokulum były liście porażonej odpowiednim izolatem PVY podatnej odmiany Samsun H, które rozcierano w moździerzu z niewielką ilością wody destylowanej. Uzyskanym w ten sposób sokiem pocierano posypane karborundem rośliny przeznaczone do testowania. Testy wykonano w warunkach szklarniowych. Zakażone rośliny chroniono

przez 48 godzin przed bezpośrednim wpływem światła słonecznego. Po 4 tygodniach od inokulacji wykonano obserwacje objawów chorobowych.

#### 5.2.1.2. Inokulacja wirusem TSWV

Testy w kierunku odporności na TSWV wykonano za pomocą metody opisanej przez Tsakiridis i Gording (1972). Tkankę liściową rozcierano w buforze fosforanowym złożonym z 9,078g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i 11,867 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , z dodatkiem 0,5% 2-merkaptoetanolu. Stosowana proporcja wynosiła 1 g tkanki liściowej na 2 ml buforu. Sok wyciskano przez sterylną gazę. Obserwacje objawów chorobowych wykonywano po 4 tygodniach od zakażenia w przypadku większości obiektów *Nicotiana*, a w przypadku badań nad gatunkiem *N. mutabilis* po 4 i 8 tygodniach oraz po 4 miesiącach od inokulacji (Tabela 3).

#### 5.2.1.3. Inokulacja wirusem TMV

Testy odpornościowe wykonano metodą sztucznej inokulacji w warunkach fitotronowych. Zakażano po 6 roślin danego obiektu będącego w fazie 5-6 liści. W doświadczeniu badano również wpływ temperatury na stopień porażenia roślin przez TMV. W tym celu zakażone rośliny umieszczono w dwóch komorach fitotronowych, gdzie temperatura powietrza wynosiła odpowiednio: 22°C w dzień i 20°C w nocy oraz 30°C w dzień i 28°C w nocy. Wilgotność względna powietrza w obydwu komorach była utrzymywana na poziomie 65% w dzień i 60% w nocy, natomiast długość dnia wynosiła 14 godzin. Po 5, 10 i 14 dniach od zakażenia prowadzono obserwacje objawów chorobowych.

### 5.2.2. Testy serologiczne

W celu potwierdzenia bądź wykluczenia obecności danego wirusa (PVY, TSWV, TMV) w roślinach zastosowano testy immunoenzymatyczne DAS-ELISA z użyciem odpowiednich przeciwciał firmy Bioreba (Szwajcaria). Testy wykonano według zaleceń producenta. Pomiar absorbancji był wykonany na czytniku płytek Tecan Sunrise przy długości fali 405 nm. Próbkę do badań pobierano w różnych terminach i z różnych części zakażonych roślin, w zależności od przeprowadzonych badań i rodzaju wirusa (tab. 3).

Tabela 3. Warunki pobierania próbek do testów immunoenzymatycznych DAS-ELISA

Artykuł	Wirus użyty do inokulacji	Piętro pobrania próbek	Termin pobrania próbek
Doroszevska i Depta, 2011	PVY	próbka zbiorcza z kilku pięter rośliny	4 tygodnie po inokulacji
Depta i in., 2020	PVY	próbka zbiorcza z kilku pięter rośliny	4 tygodnie po inokulacji
Depta i in., 2021	PVY	próbka zbiorcza z kilku pięter rośliny	4 tygodnie po inokulacji
Depta i in., 2021	TSWV	liście dolne	4 tygodnie po inokulacji
		liście środkowe	4 i 8 tygodni po inokulacji
		liście górne	4 i 8 tygodni oraz 4 miesiące po inokulacji
Laskowska i in., 2013	TSWV	liście górne i dolne	4 tygodnie po inokulacji
Depta i in., 2018	TMV	liście górne i dolne	14 dni po inokulacji

Opracowanie własne na podstawie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

### 5.2.3. Testy molekularne

#### 5.2.3.1. Izolacja DNA

Izolację genomowego DNA wykonano z zastosowaniem metody Doyle'a i Doyle (1987) z wykorzystaniem CTAB lub jej modyfikacji (Czubacka i Doroszevska, 2010). Tkanka liściowa została najpierw zhomogenizowana, a następnie połączona z buforem izolującym. Po okresie inkubacji w temp. 60°C przez 30 minut dodano roztwór chloroform - izoamyl (24:1 v/v) i mieszano przez 5 min., po czym próbkę zwirowano (4°C, 14000 rpm, 15 min.). Następnie zebrano górną fazę i przeniesiono do nowej próbówki Eppendorf i połączono z izopropanolem. Próbkę inkubowano przez 15 min. w -20°C. Kolejnym etapem było podwójne płukanie w 70% etanolu. Wyekstrahowane DNA było wysuszone i rozpuszczone w wodzie. Szczegóły dotyczące izolacji są zawarte w artykułach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

#### 5.2.3.2. Warunki reakcji PCR

Badania molekularne zostały wykonane w obrębie kolekcji *Nicotiana* w celu wykrycia obecności/braku genów związanych z odpornością na poszczególne wirusy (tab. 4). Do reakcji PCR wykorzystano primery wytypowane na podstawie literatury (Julio i in., 2015; Sierro i in., 2014; Moon i Nicholson, 2007; Lewis i in., 2005). Mieszanina reakcyjna zawierała 1 µl roślinnego DNA i odpowiednie primery, zaś pozostałe odczynniki zależały od zastosowanej polimerazy. Reakcja PCR obejmowała denaturację wstępną oraz odpowiednią

liczbę cykli o określonym czasie i temperaturze. Ostatnim etapem była końcowa elongacja w temperaturze 72°C. W celu wizualizacji uzyskanych wyników wykorzystano reakcję elektroforezy na żelu agarozowym. Ze względu na zróżnicowaną metodykę zależną od użytego markera szczegółowe dane dotyczące składu mieszaniny reakcyjnej, a także czasu i temperatury poszczególnych cykli reakcji PCR, znajdują się w publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Tabela 4. Markery wykorzystane w badaniach molekularnych poszczególnych źródeł odporności na choroby wirusowe

Rodzaj odporności	Zastosowane markery	Wielkość produktu PCR	Referencje	Artykuł
PVY	S 10760 E1	146 bp	Julio i in. 2015	Depta i in., 2020
	N-syl-eIF4E1	402 bp	Sierro i in. 2014	Depta i in., 2020, Depta i in., 2021
TSWV	ACC/CCC 172	117 bp	Moon i Nicholson, 2007	Depta i in., 2021, Laskowska i in., 2013
	ACT/CTA 169	105 bp		Laskowska i in., 2013
	AAG/CGA 228	117 bp		
	ACT/CTA 268	161 i 200 bp		
TMV	E	545 bp	Lewis i in., 2005	Depta i in., 2018
	N	359 bp		

Opracowanie własne na podstawie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

## 6. Wyniki

Przeprowadzone badania zasobów genowych rodzaju *Nicotiana* pod względem odporności na najważniejsze choroby wirusowe tytoniu wykazały duże zróżnicowanie, zarówno o charakterze biologicznym, serologicznym, jak i molekularnym.

Dwie pierwsze prace (Doroszewska i Depta, 2011; Depta i in., 2020) zawierały ocenę odporności obiektów *Nicotiana* na PVY, przy czym jedna dotyczyła dzikich gatunków *Nicotiana*, a druga odmian tytoniu uprawnego (*Nicotiana tabacum*). Ze względu na duże zróżnicowanie w obrębie PVY, w badaniach zastosowano łącznie 11 izolatów o różnej zjadliwości i serotypie. Kolejna praca (Depta i in., 2021) obejmowała szczegółowe badania nad stosunkowo nowym gatunkiem *N. mutabilis* w kierunku odporności na PVY i TSWV, gdyż badania takie nie były do tej pory prowadzone. Stopień porażenia obiektów *Nicotiana* na TSWV był przedmiotem badań opisanych w czwartej pracy (Laskowska i in., 2013) wchodzącej w skład rozprawy. Ostatnia praca (Depta i in., 2018) obejmowała zagadnienie odporności na TMV kilku dzikich gatunków oraz 62 wybranych odmian uprawnych tytoniu. Badania te prowadzono w dwóch komorach fitotronowych o różnych zakresach

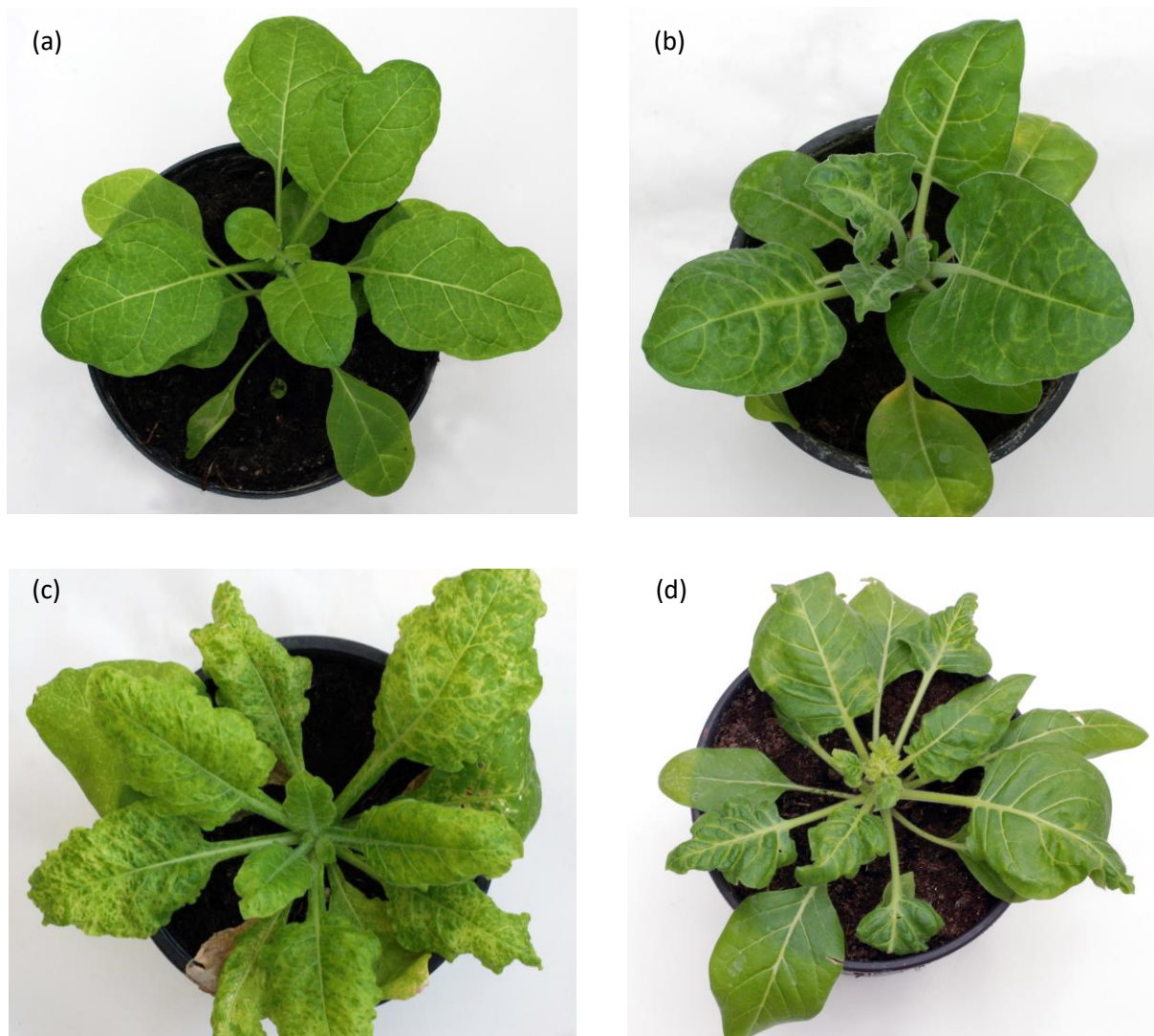
temperaturowych. W obrębie badanych obiektów wykonano testy molekularne w celu wykrycia genów związanych z odpornością na poszczególne wirusy.

### 6.1. Źródła odporności na PVY

Wykonano szczegółowe badania pod kątem odporności na PVY obejmujące 65 gatunków *Nicotiana*, 7 form autotetraploidalnych, 12 odmian botanicznych *Nicotiana rustica*, a także 34 odmiany *Nicotiana tabacum* (Doroszevska i Depta, 2011; Depta i in., 2020; Depta i in., 2021).

W pracy Doroszevskiej i Depty (2011) przedstawiono wyniki oceny odporności dzikich gatunków *Nicotiana* na różne izolaty PVY (patrz Tabela 1, Doroszevska i Depta, 2011). Szczegółowa analiza danych pozwoliła stwierdzić, że w obrębie rodzaju *Nicotiana*: *N. africana*, *N. raimondii*, *N. knightiana* wykazują immunię na wszystkie badane izolaty. Forma tetraploidalna *N. glauca* również była całkowicie odporna na 6 izolatów, ale forma diploidalna tego gatunku została porażona izolatem PVY<sup>NZ</sup> dając, pomimo braku objawów, pozytywny wynik testu DAS-ELISA. Izolat PVY<sup>NZ</sup> wywołał też chlorotyczne pierścienie u *N. benavidesii*, zaś pozostałe izolaty nie poraziły tego gatunku. Odporność na trzy z sześciu izolatów PVY wykazały gatunki: *N. solanifolia*, *N. cordifolia*, *N. otophora*, *N. setchellii* i *N. petunioides*. W obrębie odmian botanicznych *N. rustica* również zaobserwowano zróżnicowanie odporności. Odmiana *N. rustica* var. *brasilia* wykazała odporność wobec trzech izolatów, odmiana *N. rustica* var. *pumila* wobec dwóch izolatów, odmiana *N. rustica* var. *neuchestii* wobec jednego, a na pozostałych odmianach tego gatunku zaobserwowano słabe objawy chorobowe w postaci plam chlorotycznych i przejaśnień nerwów. Odporne tylko na jeden, najsłabszy izolat PVY<sup>NW</sup>(-), okazały się gatunki: *N. tomentosiformis*, *N. kawakami* oraz *N. longiflora*.

Przeprowadzone badania wykazały, że 26 gatunków *Nicotiana* wykazało objawy tolerancji na wszystkie badane izolaty. Objawy te obejmowały przejaśnienia nerwów u *N. stoctonii* (ryc. 6a) i *N. undulata* (ryc. 6b), plamy i pierścienie chlorotyczne oraz deformacje i przebarwienia mozaikowe u *N. nesophila* (ryc. 6c) i *N. acuminata* (ryc. 6d). Jednocześnie u tych obiektów nie wystąpiły nekrozy nerwów, co jest charakterystyczne dla tolerancji.



Rycina 6. Objawy tolerancji w postaci przejaśnień nerwów na roślinach *N. glauca* (a) i *N. glauca* (b) oraz deformacji i przebarwień mozaikowych na *N. glauca* (c) i *N. glauca* (d) (Źródło: fot. A. Depta)

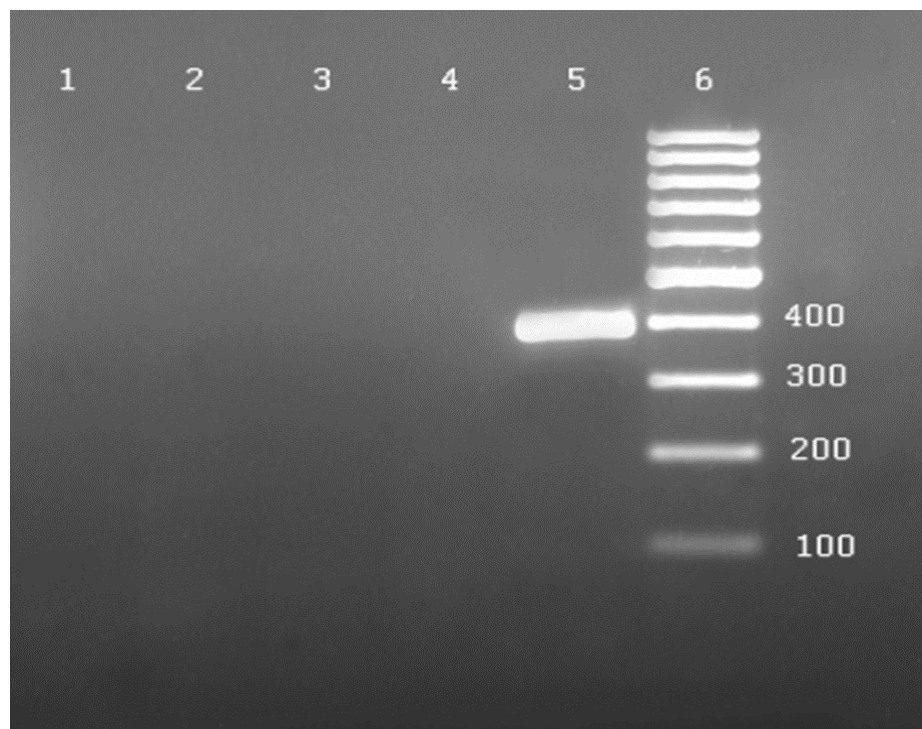
Podatny na infekcję wszystkimi badanymi izolatami PVY okazał się gatunek *N. repanda*, zarówno w formie diploidalnej, jak i tetraploidalnej oraz odmiany botaniczne *N. tabacum*. Objawem chorobowym świadczącym o silnym porażeniu była nekroza nerwów, która czasem prowadziła do zamierania roślin w wyniku systemicznej infekcji. U części obiektów wystąpienie nekrozy nerwów lub porażenia systemicznego było efektem inokulacji jednym lub kilkoma izolatami (Doroszevska i Depta, 2011).

Analizując uzyskane wyniki badań pod kątem reakcji odpornościowej w obrębie sekcji można stwierdzić, że w 8 z 13 sekcji występują gatunki wykazujące całkowitą lub częściową odporność na PVY. Do sekcji posiadających najwięcej gatunków z odpornością na co najmniej 1 izolat PVY możemy zaliczyć *Tomentosae*, *Paniculatae* oraz *Noctiflorae*.



W obrębie sekcji *Alatae*, *Suaveolentes* i *Undulatae* znaleziono po jednym takim gatunku. Natomiast w sekcjach *Rusticae* i *Nicotiana* odporność zależała od odmiany.

Przedmiotem badań Depty i in. (2021) był stosunkowo nowy gatunek *N. mutabilis* i dwa gatunki pokrewne: *N. alata* i *N. forgetiana* należące do tej samej sekcji (tab. 5). W wyniku zakażenia dwoma izolatami o zróżnicowanej zjadliwości zaobserwowano jedynie przejaśnienia nerwów (patrz Figure 1(a) w: Depta i in., 2021), a w przypadku *N. forgetiana* dodatkowo pomarszczone liście i objawy mozaikowe. Nie zaobserwowano nekrozy nerwów, co może świadczyć o tym, że gatunki te są tolerancyjne. Badania molekularne roślin wykazały ponadto brak markera Nsyl-eIF4E1, który jest związany z genem podatności *Va* na PVY (ryc. 7).



Rycina 7. Amplifikacja markera Nsyl-eIF4E1 związanego z genem podatności *Va*: 1 – *N. mutabilis*; 2 – *N. alata*; 3 – *N. forgetiana*; 4 – *N. tabacum* cv. VAM; 5 – *N. tabacum* cv. Burley 21; 6 – marker wielkości DNA 100bp. (Źródło: Depta i in., 2021)

Tabela 5. Obecność markera Nsyl-eIF4E1 charakterystycznego dla genu podatności *Va* oraz reakcja badanych gatunków na inokulację dwoma izolatami PVY (Źródło: Depta i in., 2021)

Obiekt	Obecność markera Nsyl-eIF4E1	Izolat PVY			
		IUNG 21 (słaby)		IUNG 20 (silny)	
		Objawy	Wyniki DAS-ELISA	Objawy	Wyniki DAS-ELISA
<i>Nicotiana mutabilis</i>	-	VC	+	VC	+
<i>Nicotiana glauca</i>	-	VC	+	VC	+
<i>Nicotiana glauca</i>	-	VC, WL	+	VC, WL, MS	+
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. VAM	-	ns	-	VN	+
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Burley 21	+	VN	+	VN	+

Objaśnienia: ns – brak objawów (ang. no symptoms); VN – nekroza nerwów (ang. vein necrosis); VC – przejaśnienia nerwów (ang. vein clearing); WL – pomarszczone liście (ang. wrinkled leaves); (+) pozytywny / (-) – negatywny wynik testu DAS-ELISA w kierunku obecności PVY;

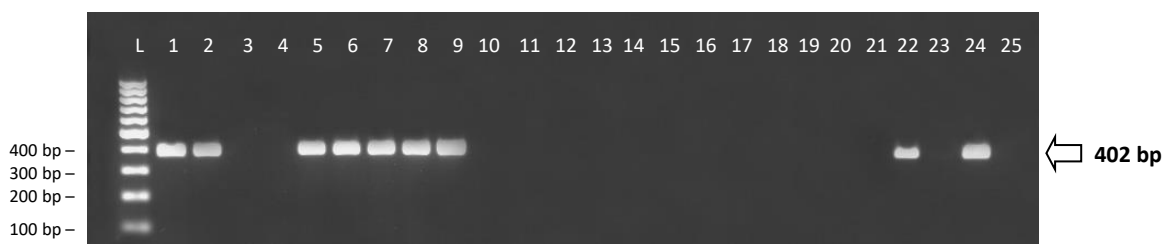
Dwie odmiany tytoniu uprawnego były użyte jako obiekty kontrolne. Odmiana podatna Burley 21, posiadająca gen podatności *Va* na PVY, zareagowała wystąpieniem nekroz nerwów niezależnie od użytego izolatu. Odmiana VAM, posiadająca odporność typu *va*, została porażona jedynie przez silny izolat IUNG 20, który ma zdolność przełamania tego typu odporności (patrz Figure 1(b) w: Depta i in., 2021).

Szerokie badania nad odpornością 25 odmian uprawnych *Nicotiana tabacum* z użyciem czterech izolatów podjęto w pracy Depty i in. (2020) (Tabela 6). Objęły one także analizy molekularne na obecność genu podatności *Va* na PVY (ryc. 8). Wyniki tych testów pozwoliły podzielić badane obiekty na dwie grupy. Pierwszą grupę stanowiło 16 odmian, w których nie amplifikowano markerów S10760 E1 oraz Nsyl-eIF4E1, co świadczy o delecji w obrębie genu podatności *Va*. W drugiej grupie znajdowały się odmiany, w których wykryto markery związane z genem podatności *Va*.

Tabela 6. Obecność markerów związanych z genem *Va* podatności na PVY w odmianach tytoniu oraz reakcja odpornościowa roślin i test DAS-ELISA po zakażeniu czterema izolatami PVY (opracowanie własne na podstawie publikacji Depta i in., 2020)

Odmiana	Obecność markerów S10760 E1 / Nsyl-eIF4E1	Reakcja roślin na inokulację izolatami PVY oraz wynik testu DAS-ELISA							
		IUNG 23		IUNG 17		IUNG 22		IUNG 20	
VAM	-/-	ns	-	ns	-	VN	+	VN	+
Wiślica, Wiecha, Bachus, V. SCR, Wiktoria, Weneda	-/-	ns	-	VN	+	VN	+	VN	+
Havana 307, Havana IIC, Wilga, Krak, Wiera, Warta, Wika, Wanda, Wisana	-/-	VN	+	VN	+	VN	+	VN	+
Złotolistny IHAR, LB Koro, Virginia Gold Dolar, Virginia 278, Zamojska 4	+/+	VC, CS	+	VC, CS	+	VC, CS	+	VC	+
Prezydent, Virginia Joyner, Samsun H	+/+	VN	+	VN	+	VN	+	VN	+
Węgierski Ogrodowy	+/+	ns	-	VC, CS	+	VN	+	VN	+

Objaśnienia: ns – brak objawów (ang. no symptoms); VN – nekroza nerwów (ang. vein necrosis); VC – przejaśnienia nerwów (ang. vein clearing); (+) pozytywny / (-) negatywny wynik testu DAS-ELISA w kierunku obecności PVY; **Izolaty PVY**: IUNG 23 – słaby izolat; IUNG 17 – średni izolat; IUNG 22 i IUNG 20 - silne izolaty.



Rycina 8. Elektroforetyczna analiza produktów amplifikacji markera Nsyl-eIF4E1 (produkt o wielkości 402 bp) w odmianach tytoniu: 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 (Źródło: Depta i in., 2020)

U odmian posiadających odporność typu *va* wykazano zróżnicowany stopień odporności w zależności od użytego izolatu PVY. Najwyższą odporność posiadała odmiana VAM, która nie poraziła się dwoma izolatami: IUNG 23 i IUNG 17, zaś pozostałe izolaty

spowodowały nekrozę nerwów (patrz Rycina 2 w: Depta i in., 2020). Brak objawów chorobowych oraz negatywny wynik testów DAS-ELISA na izolat IUNG 23 wystąpił również u sześciu odmian z recesywnym genem *va*: Wiecha, Bachus, Wiktorija, Weneda, Wiślica i V. SCR. Natomiast pozostałe izolaty spowodowały na tych odmianach wystąpienie nekrozy nerwów, a wynik testu DAS-ELISA był pozytywny. Dziewięć odmian posiadających odporność typu *va* zostało porażonych przez wszystkie zastosowane izolaty wirusa Y ziemniaka, co skutkowało nekrozami nerwów. Należały tu odmiany: Krak (ryc. 9), Havana 307, Havana IIC, Wilga, Wiera, Warta, Wika, Wanda i Wisana.



Rycina 9. Nekrozy nerwów na odmianie Krak po porażeniu przez wirusa Y ziemniaka (fot. A. Depta)

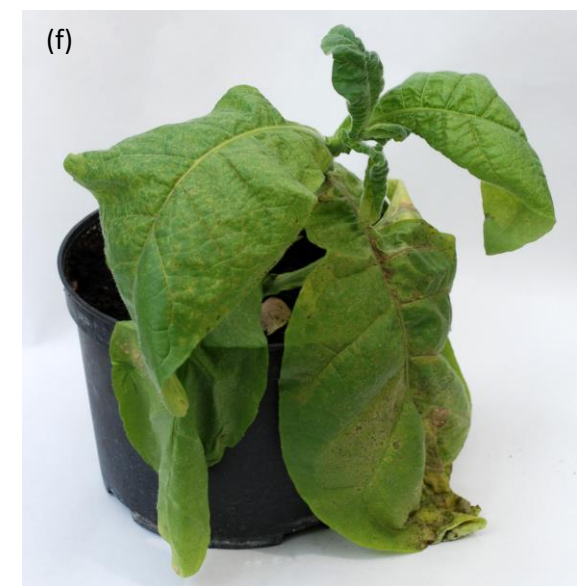
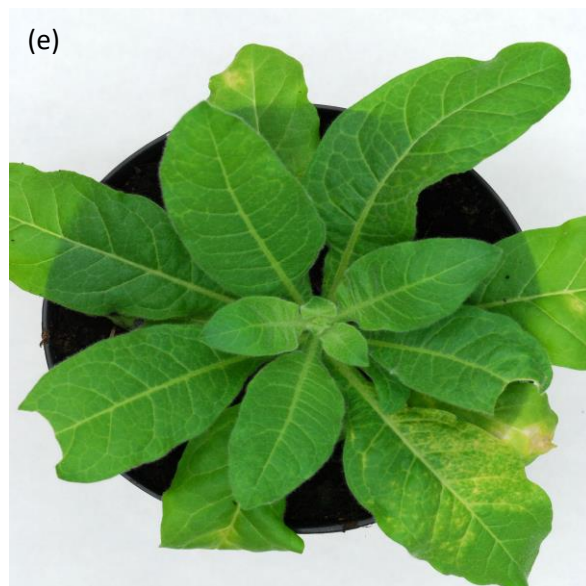
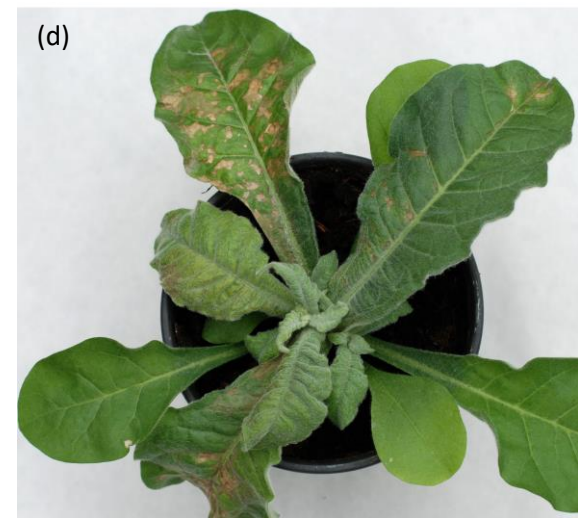
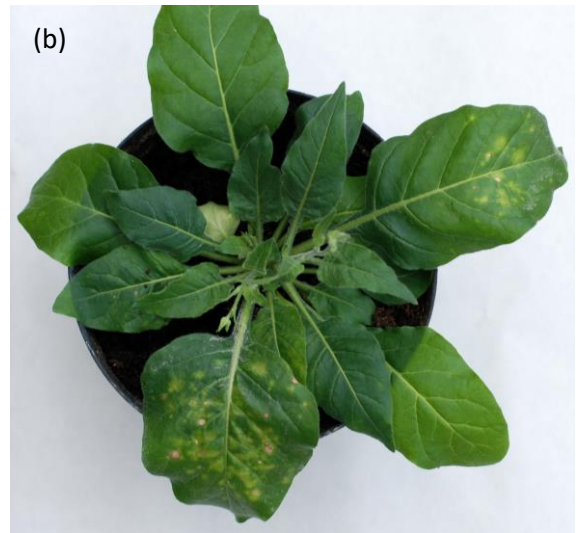
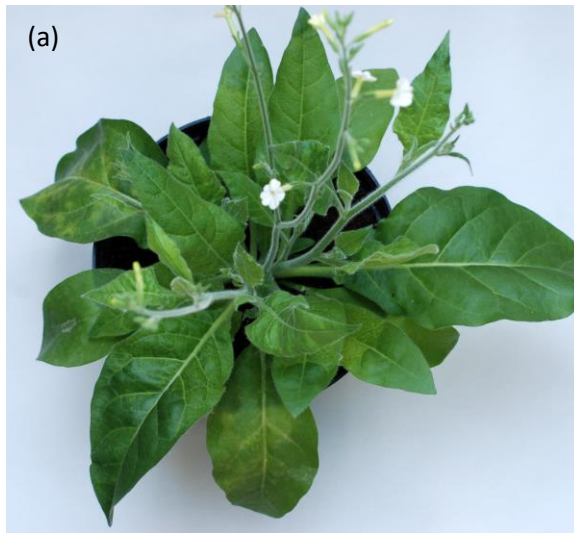
Drugą wspomnianą grupę stanowiły odmiany posiadające gen podatności *Va* i w niej również wykazano zróżnicowanie. Po inokulacji wszystkimi izolatami, w obrębie tej grupy, znajdowało się pięć odmian: Złotolistny IHAR, LB Koro, Virginia Gold Dolar, Virginia 278 oraz Zamojska 4, u których wystąpiły jedynie przejaśnienia nerwów i plamy chlorotyczne, bez nekrozy nerwów (patrz Rycina 3 w: Depta i in., 2020). Test DAS-ELISA potwierdził obecność wirusa w tkankach tych roślin. Z tego powodu odmiany te określono jako tolerancyjne. Nekrozy nerwów, po zastosowaniu wszystkich izolatów PVY, wystąpiły u trzech odmian (Prezydent, Virginia Joyner i Samsun H) i dlatego określono je jako podatne.

Najbardziej zróżnicowaną reakcję odpornościową na użyte izolaty zaobserwowano dla odmiany Węgierski Ogrodowy. Odmiana ta, pomimo posiadania genu podatności *Va*, nie poraziła się izolatem IUNG 23, co zostało potwierdzone negatywnym wynikiem testu

DAS-ELISA. Natomiast przejaśnienia nerwów i plamy chlorotyczne wystąpiły po zastosowaniu izolatu IUNG 17 i obecność wirusa w tkankach została potwierdzona badaniem immunoenzymatycznym. Z kolei inokulacja izolatami IUNG 22 i IUNG 20 spowodowała wystąpienie nekroz nerwów.

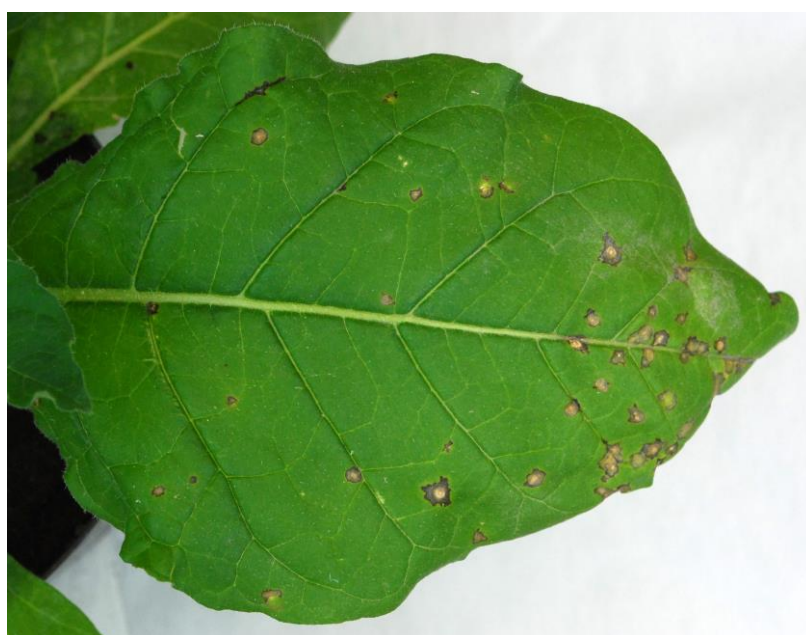
## 6.2. Źródła odporności na TSWV

Reakcja odpornościowa obiektów z rodzaju *Nicotiana* na TSWV była przedmiotem badań zawartych w dwóch publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (Laskowska i in., 2013; Depta i in. 2021). Badania objęły 99 obiektów, w tym 63 gatunki. Wykazano zróżnicowanie reakcji odpornościowej w obrębie kolekcji. Objawy w postaci przejaśnień nerwów (najczęściej na połowie liścia) oraz plam chlorotycznych, ale bez obecności nekroz nerwów zaobserwowano u *N. petunioides*, *N. benavidesii*, *N. velutina* (ryc. 10a), *N. otophora*, *N. setchellii*, *N. obtusifolia*, *N. palmerii* (ryc. 10e), *N. arentsii* i *N. wigandioides*. Większość badanych obiektów, bo aż 71 (patrz Tabela 1 w: Laskowska i in., 2013) rozwinęła znacznie silniejsze objawy infekcji. Objawy te obejmowały chlorotyczne i nekrotyczne pierścienie (ryc. 10b) oraz nieregularne plamki (ryc. 10d), które pojawiły się na inokulowanych liściach 7 dni po inokulacji i z czasem zwiększały swój rozmiar. W ciągu następnych 14 dni pojawiły się przejaśnienia nerwów, deformacje liści (ryc. 10c) oraz charakterystyczne wygięcie wierzchołka (ryc. 10f). Obecność wirusa w górnej części rośliny została potwierdzona za pomocą testu DAS-ELISA. U części z tych obiektów infekcja wirusem TSWV spowodowała skarłowacenie, a nawet zamieranie roślin.



Rycina 10. Zróźnicowana reakcja odpornościowa na TSWV w obrębie rodzaju *Nicotiana*: (a) *N. velutina*, (b) *N. ingulba*, (c) *N. rustica* var. *texana*, (d) *N. maritima*, (e) *N. palmerii*, (f) *N. tabacum* var. *artropurpurea*

Dużo uwagi poświęcono wybranym gatunkom z sekcji *Alatae* oraz dwóm odmianom tytoniu uprawnego (Polalta i Wiktorja), które zawierają czynnik odporności od *N. alata*. U części z tych obiektów wystąpiła reakcja nadwrażliwości (Hypersensitive Reaction, HR). Polegała ona na pojawieniu się po 5-7 dniach od inokulacji początkowo żółtych, a następnie nekrotycznych, miejscowych plamek. U gatunków *N. alata*, *N. forgetiana* oraz mieszańca *Nicotiana x sanderae* nekrotyczne plamki miały średnicę 6-7 mm, a u odmian Polalta i Wiślica średnica wynosiła 2-3 mm. W roślinach, które wykazywały tylko reakcję nadwrażliwości, wirus był wykrywany jedynie w obrębie plamek nekrotycznych. Nowe nieinokulowane liście były wolne od wirusa. Badane populacje *N. alata* oraz *Nicotiana x sanderae* okazały się niejednorodne. W obrębie dwóch spośród siedmiu populacji *N. alata*, jednej spośród czterech populacji *Nicotiana x sanderae* oraz dla odmiany Polalta wszystkie badane rośliny wykazały jedynie reakcję nadwrażliwości (ryc. 11). W obrębie innych populacji *N. alata* i *Nicotiana x sanderae* u niektórych roślin po 14 dniach od inokulacji wystąpiła systemiczna reakcja nadwrażliwości (Systemic Hypersensitive Reaction, SHR). Rośliny z objawami systemicznymi (SHR) stanowiły 6,3 - 50,0 % badanych populacji *N. alata* i od 16,7 do 50,0 % badanych populacji *Nicotiana x sanderae*. Cztery spośród 19 roślin odmiany Wiktorja wykazało reakcję nadwrażliwości, a pozostałe okazały się podatne. U gatunku *N. forgetiana* wystąpiła reakcja nadwrażliwości na porażenie TSWV po 5 dniach od inokulacji, ale w ciągu kolejnych 10 dni objawy infekcji się nasiliły powodując u wszystkich roślin porażenie systemiczne. Obecność wirusa w nieinokulowanych liściach tego gatunku została potwierdzona za pomocą testu DAS-ELISA.



Rycina 11. Reakcja nadwrażliwości w postaci nekrotycznych plamek u gatunku *N. alata*

Szczegółowe badania dotyczące odporności na TSWV przeprowadzono dla stosunkowo nowego i jak dotąd nieprzebadanego gatunku *Nicotiana glutabata*. Wyniki tych badań zamieszczono w pracy Depta i in. (2021). Jako obiekty kontrolne zastosowano dwa gatunki pokrewne: *N. alata* i *N. glauca* oraz dwie odmiany *N. glutabata*: VAM i Burley 21. Reakcja odpornościowa gatunku *N. glutabata* była zróżnicowana u poszczególnych roślin, co było widoczne podczas obserwacji wykonywanych w tym samym terminie. Zmiany w stopniu porażenia obserwowano także, w zależności od czasu jaki minął od inokulacji oraz od badanego piętra roślin (patrz Tabela 3 w: Depta i in., 2021). W I terminie czyli 4 tygodnie od zakażenia u 97,5 % roślin na liściach piętra dolnego obserwowano objawy nadwrażliwości w postaci plam nekrotycznych. Obecność wirusa została potwierdzona testami DAS-ELISA. Na liściach piętra środkowego u 75 % roślin zaobserwowano plamy chlorotyczne (CS), które następnie przekształcały się w plamy nekrotyczne (patrz Figure 3 w: Depta i in., 2021) charakterystyczne dla reakcji nadwrażliwości (HR) i wirus był wykrywany przez przeciwciała. U pozostałych roślin liście tego piętra pozostały zdrowe. W pierwszym terminie pobrania próbki wykazano, że jedynie u 25 % roślin wirus był wykrywany w górnym piętrze roślin.

W II terminie, czyli po 8 tygodniach od zakażenia, przebadano jedynie piętro środkowe i górne, gdyż liście piętra dolnego obumarły. Badania wykazały, że w przypadku 77,5 % roślin liście piętra środkowego zostały porażone przez TSWV, o czym świadczyły objawy chorobowe w postaci chlorotycznych i nekrotycznych plam oraz pozytywny wynik testu DAS-ELISA. W porównaniu do terminu I liczba roślin, dla których liście z piętra górnego posiadały objawy chorobowe zmniejszyła się do 12,5 %, i tylko w tych roślinach wirus był wykrywany w soku badanych liści. W III terminie czyli po 4 miesiącach od zakażenia pobrano próby jedynie z piętra górnego, które obejmowało 4 najmłodsze w danym momencie liście. Celem badania było sprawdzenie, czy wirus na stałe został zatrzymany poprzez nekrozę tkanki w obrębie piętra środkowego. Niestety u 30 % badanych roślin zaobserwowano plamy chlorotyczne i nekrotyczne na liściach piętra górnego, zaś obecność wirusa TSWV w tych liściach została potwierdzona za pomocą DAS-ELISA. Rośliny *N. glutabata* inokulowane tylko buforem nie wykazywały objawów chorobowych w żadnym z tych badanych terminów.

Dwa pozostałe gatunki należące do sekcji *Alatae*, tj. *N. alata* i *N. glauca*, zareagowały w odmienny sposób niż *N. glutabata*. U *N. alata* po 4 tygodniach od zakażenia na liściach piętra dolnego zaobserwowano typowe objawy nadwrażliwości w postaci



nekrotycznych plam i tam wirus był wykrywany serologicznie. Natomiast liście z piętra środkowego i górnego tego gatunku badane w I terminie nie wykazywały objawów chorobowych i wynik testu DAS-ELISA był negatywny (patrz Rysunek 4 w: Depta i in., 2021). Również liście pobrane po 8 tygodniach i 4 miesiącach nie zostały porażone przez TSWV. Zupełnie inaczej wyglądało porażenie u gatunku *N. forgetiana*. Po 4 tygodniach od zakażenia na liściach dolnych wszystkich 10 badanych roślin zaobserwowano plamy nekrotyczne świadczące o reakcji nadwrażliwości. U tego gatunku liście z piętra środkowego i górnego zostały również porażone, a zaobserwowane objawy obejmowały pomarszczenie liści i zahamowanie wzrostu roślin (Patrz Rysunek 5 w: Depta i in., 2021). Objawy te utrzymywały się także w II i III terminie pobrania, a wyniki testów serologicznych były pozytywne dla wszystkich badanych prób.

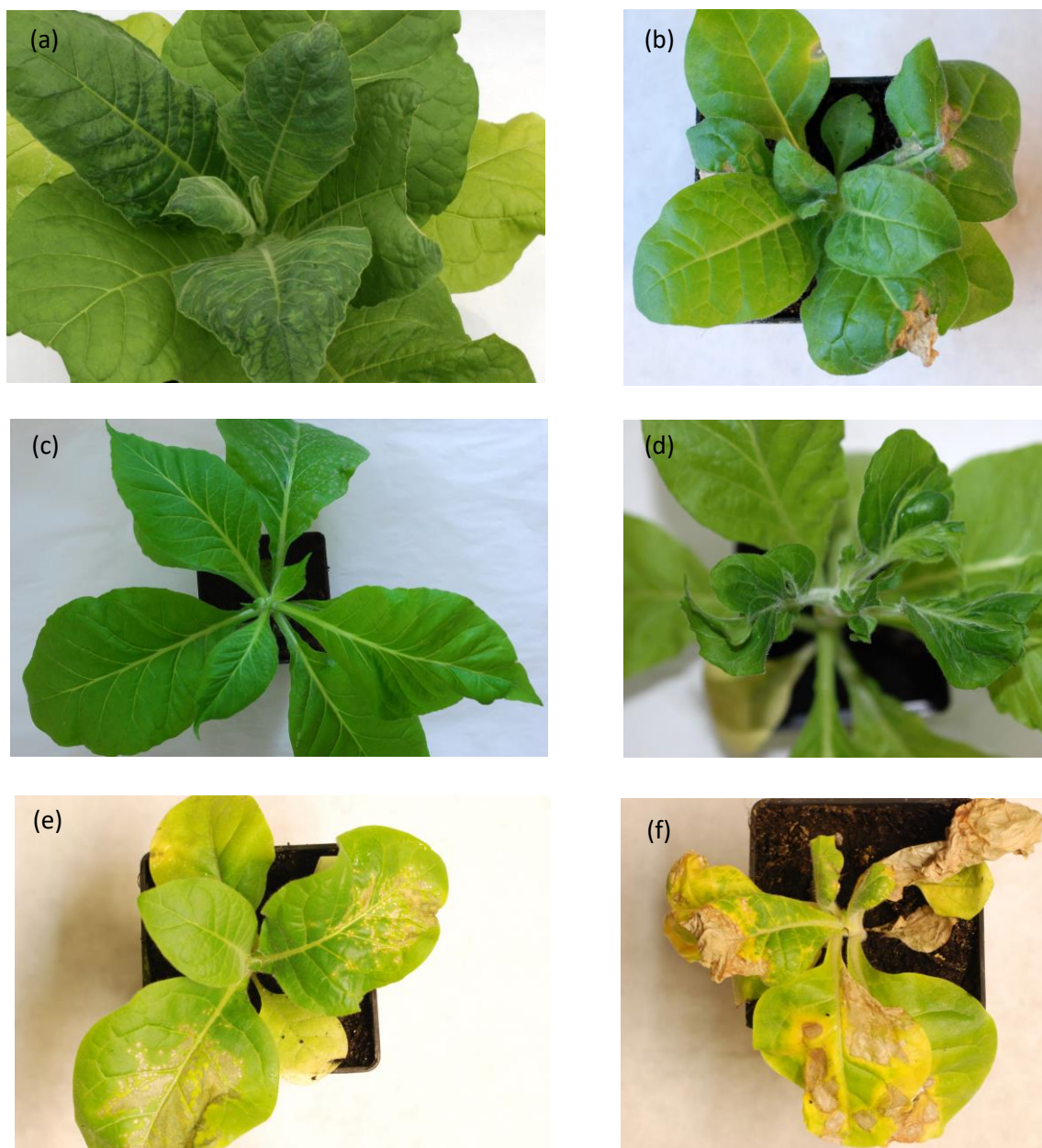
Do badań odpornościowych na TSWV włączono dwie odmiany tytoniu uprawnego *Nicotiana tabacum*: VAM i Burley 21, które zareagowały silnym porażeniem na TSWV niezależnie od piętra i czasu pobrania próbki (patrz Rysunek 6 w: Depta i in., 2021). Już po 4 tygodniach od zakażenia na dolnych i środkowych liściach wystąpiły przejaśnienia nerwów i plamy chlorotyczne, zaś w obrębie piętra górnego zaobserwowano zagięty wierzchołek i zahamowany wzrost roślin. Ta tendencja utrzymywała się również w dwóch późniejszych terminach obserwacji. We wszystkich pobranych próbkach został wykryty wirus TSWV.

Analiza molekularna z wykorzystaniem czterech markerów SCAR została wykonana dla wszystkich gatunków z sekcji *Alatae* oraz dwóch odmian tytoniu: Polalta i Wiktoria (Laskowska i in., 2013). W badaniach Depty i in. (2021) dotyczących *N. mutabilis* i obiektów kontrolnych został użyty tylko jeden SCAR marker ACC/CCC172. W obu przypadkach gatunki *N. alata* i *N. forgetiana* amplifikowały markery związane z odpornością na TSWV. Mieszaniec *Nicotiana x sanderae* oraz odmiana Polalta amplifikowały wszystkie cztery markery związane z tą odpornością. Natomiast spośród 19 badanych roślin odmiany Wiktoria tylko w przypadku czterech (21,1 %), które jednocześnie wykazały reakcję nadwrażliwości, wykryto obecność markerów. Również w *N. mutabilis* wykryto SCAR marker ACC/CCC 172. Pozostałe obiekty badane (*N. langsdorfii*, *N. longiflora*, *N. plumbaginifolia*, *N. tabacum* cv. Wiślica, *N. tabacum* cv. VAM, *N. tabacum* cv. Burley 21) nie posiadały żadnego ze SCAR markerów związanych z odpornością na TSWV (patrz Tabela 2 w: Laskowska i in., 2013) i wykazywały podatność na TSWV.

### 6.3. Źródła odporności na TMV

W zależności od podłoża genetycznego oraz warunków temperaturowych zaobserwowano cztery typy reakcji roślin na TMV (patrz Tabela 1 w: Depta i in., 2013). Najczęstszą reakcją odmian tytoniu uprawnego w każdej z zastosowanych temperatur była podatność. Polegała ona na występowaniu na roślinach przebarwień mozaikowych na liściu (ryc. 12a). Dodatkowo obserwowano zahamowanie wzrostu oraz żółknięcie roślin. W przypadku odmian wykazujących zmiany o charakterze mozaikowym testy ELISA potwierdziły obecność wirusa w roślinach. Podwyższone miano antygenu stwierdzono zarówno w dolnych jak i górnych liściach, niezależnie od temperatury w jakiej prowadzone było doświadczenie.

Drugą grupę stanowiły obiekty, które wykazywały tolerancję polegającą na tym, że w tkankach następowało namnażanie wirusa, ale na roślinie nie obserwowano objawów chorobowych. Jednak reakcja była zależna od warunków środowiskowych, tj. temperatury powietrza. Przy temperaturze 22/20°C nie notowano żadnych plam czy przejaśnień na liściach (ryc. 12c). Natomiast przy temperaturze 30/28°C na roślinach pojawiały się silne przebarwienia mozaikowe (ryc. 12d). Ten typ reakcji zanotowano u kolumbijskiej odmiany Ambalema oraz kilku gatunków rodzaju *Nicotiana*: *N. glauca*, *N. wigandioides* i *N. africana*. U odmian tolerancyjnych testy serologiczne pozwoliły wykazać obecność wirusa na obu badanych poziomach rośliny, nawet wówczas, gdy zmiany mozaikowe były niewidoczne.



Rycina 12. Reakcja odpornościowa obiektów *Nicotiana* na TMV: (a) objawy mozaikowe na podatnej odmianie Wiślica w temp. 22/20°C, (b) brak objawów chorobowych na górnych liściach na odpornym gatunku *N. glauca* w temp. 30/28°C, (c) reakcja bezobjawowa na tolerancyjnej odmianie Ambalema w temp. 22/20°C, (d) objawy chorobowe na tolerancyjnej odmianie Ambalema w temp. 30/28°C, (e) reakcja nadwrażliwości na odmianie Ky10 posiadającej gen *N* w temp. 22/20°C, (f) systemiczna reakcja nadwrażliwości na odmianie Ky10 posiadającej gen *N* w temp. 30/28°C.

Kolejną grupę stanowiły obiekty wykazujące reakcję nadwrażliwości (HR), polegającą na lokalnym zamieraniu tkanek wokół miejsca infekcji, co uniemożliwia wirusowi rozprzestrzenianie się po roślinie. Ten typ odporności znaleziono u 14 odmian *Nicotiana tabacum* oraz u 7 dzikich gatunków *Nicotiana*. Badania wykazały, że w przypadku odmian uprawnych tytoniu oraz niektórych dzikich gatunków reakcja nadwrażliwości jest zależna

od temperatury. Badania serologiczne roślin, które rosły w temperaturze 22/20°C wykazały obecność wirusa jedynie w dolnych liściach w obrębie plamek nekrotycznych (ryc. 12e). Liście górne, bez objawów chorobowych, nie posiadały wirusa. Testy ELISA roślin, które rosły w temperaturze 30/28°C i wykazywały systemiczną reakcję nadwrażliwości (SHR) potwierdziły obecność wirusa mozaiki tytoniu zarówno w dolnych jak i górnych liściach. Systemiczna reakcja nadwrażliwości, czyli czwarty typ reakcji na TMV, polegała na przejściu od przejaśnień i drobnych nekroz na dolnych liściach do rozległych nekroz na całej powierzchni rośliny oraz zamieraniu wierzchołka wzrostu (ryc. 12f). Gatunek *Nicotiana rustica* wykazywał systemiczną reakcję nadwrażliwości już w temperaturze 22/20°C, natomiast u *N. glauca* nie odnotowano reakcji SHR nawet w temperaturze 30/28°C (ryc. 12b).

W celu potwierdzenia obecności genu *N* w obiektach należących do kolekcji IUNG-PIB w Puławach przeprowadzono analizy molekularne z użyciem dwóch primerów E i N. Badania wykazały obecność genu *N* we wszystkich odmianach *Nicotiana tabacum* wykazujących reakcję nadwrażliwości (HR) (patrz Tabela 1 w: Depta i in., 2018,). Dla odmian podatnych (S) i tolerancyjnych (T) nie obserwowano produktu amplifikacji na żelu agarozowym, co świadczyło o braku genu *N* warunkującego odporność na TMV. Nieco inaczej wyglądała sytuacja w przypadku dzikich gatunków. Obecność genu *N* została potwierdzona jedynie u *Nicotiana glutinosa*, natomiast u pozostałych gatunków wykazujących reakcję nadwrażliwości nie wykazano obecności tego genu. Uzyskane wyniki wskazują, że obecność genu *N* warunkowała odporność odmian tytoniu w temperaturze powietrza 22/20°C.

## 7. Dyskusja

Duże zróżnicowanie gatunków w obrębie rodzaju *Nicotiana* sprawia, że stanowią one cenną pulę genową wykorzystywaną w pracach hodowlanych, ale pozyskanie ich każdorazowo z warunków naturalnych jest trudne. Jednocześnie hodowla, selekcja najlepszych genotypów i uzyskiwanie odmian tytoniu o określonych cechach powoduje zmniejszenie różnorodności genetycznej. Ochrona zasobów genowych jest więc kwestią priorytetową. Z tego powodu konieczne jest tworzenie kolekcji, gdzie w kontrolowanych warunkach możliwy jest prawidłowy wzrost i rozwój obiektów *Nicotiana*, a uzyskane w ten sposób nasiona są utrzymywane w stanie żywotności i przez to dostępne do badań i hodowli.

Zróżnicowanie genetyczne w obrębie obiektów *Nicotiana tabacum*, jak i dzikich gatunków z rodzaju *Nicotiana* jest ogromne. Jednakże, aby w pełni wykorzystać

zgromadzone zasoby plazmy zarodkowej konieczna jest ich szczegółowa charakterystyka. Biorąc pod uwagę prace hodowlane, jedna z najważniejszych informacji dotyczy odporności na choroby i szkodniki. Istotne miejsce zajmują choroby wirusowe z powodu braku skutecznej ochrony przed tymi patogenami. W związku z tym wykonano ocenę odporności wybranych obiektów *Nicotiana* na trzy choroby wirusowe powodujące ogromne straty w uprawie tytoniu w Polsce i na świecie.

### **7.1. Ocena odporności na PVY w obrębie rodzaju *Nicotiana***

Określenie charakteru odporności odmian tytoniu na PVY, identyfikacja odmian mających odporność typu *va* oraz ocena trwałości tej odporności w zależności od użytego izolatu PVY była przedmiotem pracy „Zróżnicowanie reakcji odpornościowej wybranych odmian tytoniu (*Nicotiana tabacum*) w zależności od użytego izolatu wirusa Y ziemniaka (PVY)” (Depta i in., 2020). Na podstawie analiz molekularnych badanych 25 odmian wyodrębniono 16 odmian, w których nie amplifikowano zastosowanych markerów specyficznych dla genu podatności *Va*, co może świadczyć o recesywnej formie tego genu. Jednakże reakcja tych obiektów na zastosowane izolaty PVY była zróżnicowana. Najwyższą odpornością charakteryzowała się odmiana VAM, która nie została porażona słabym i średnim izolatem, ale na pozostałe dwa, określane jako silne, reagowała nekrozami nerwów. Wyniki innych badań wykazały wysoką odporność odmiany VAM na japońskie izolaty PVY T (Masuta i in., 1999) oraz polskie izolaty należące do grupy PVY<sup>NW</sup> i PVY<sup>NTN</sup> (Doroszevska i Czubačka, 2008). W obrębie pozostałych odmian z odpornością typu *va*, badanych przez Deptę i in. (2020), sześć z nich, w tym odmiana Wiślica i V. SCR, było odpornych na izolat słaby, a dziewięć zostało porażonych przez wszystkie izolaty PVY. Dane literaturowe wskazują, że odmiana VAM wykazuje wysoką odporność ze względu na posiadanie dwóch genów recesywnych: *va1* i *va2*, które ograniczają zarówno przemieszczanie się wirusa z komórki do komórki, jak również ograniczają akumulację tego wirusa (Acosta-Leal i Xiong, 2008). Natomiast odmiana Wiślica posiada słabszy allel *va1* (Verrier i Doroszevska, 2002), zaś u odmiany V. SCR wykazano obecność allelu *va2* (Lacroix i in., 2010). Przedstawione zależności zostały potwierdzone w badaniach Korbeckiej i in. (2017b), gdzie po zastosowaniu 10 izolatów PVY, najwyższą odporność wykazała odmiana VAM, potem Wiślica, a najmniej satysfakcjonujące wyniki uzyskano dla odmiany V. SCR. Julio i in. (2015) przeprowadzili szczegółowe badania 163 obiektów *Nicotiana tabacum* łączące inokulację izolatami PVY<sup>N</sup> z analizą molekularną. U obiektów, które miały

objawy chorobowe, uzyskano produkt amplifikacji wszystkich zastosowanych markerów, w tym S10760, który związany jest z genem podatności *Va*. Natomiast obiekty uznane za odporne podzielono na trzy grupy. Pierwsza obejmowała 45 odmian, które nie amplifikowały żadnego markera, co może być skutkiem dużej delecji w obrębie genu podatności *Va*. Do drugiej grupy należały cztery odmiany, które amplifikowały zastosowane markery, z wyjątkiem S10760, co może być związane z mniejszą delecją. Produkt amplifikacji dla wszystkich markerów zaobserwowano dla 13 obiektów, które jednocześnie nie posiadały objawów chorobowych. Szczegółowe badania z zastosowaniem sekwencjonowania wykazały, że posiadają one delecję obejmującą dwie pary zasad w pozycji 478-479. W celu oceny trwałości odporności na PVY, spośród obiektów odpornych badanych przez Julio i in. (2015) wytypowano cztery grupy różniące się długością mutacji i poddano je inokulacji 9 izolatami PVY o zróżnicowanej zjadliwości (Michel i in., 2019). Należące do grupy pierwszej (tzw. LD-Large Deletion) odmiany VAM, Wiślica, TN86 i PBD6 posiadały dużą delecję na chromosomie 21. Najwyższą odporność w tej grupie posiadała odmiana VAM, a najslabszą PBD6. Wytypowane do badań odmiany o mniejszej delecji na chromosomie 21 (tzw. SD – Small Deletion), odmiany z delecją o wielkości dwóch par zasad, jak również mutanty otrzymane w wyniku działania metanosulfonianu etylu, wykazały znacznie mniejszą odporność na PVY niż odmiany z grupy pierwszej. Wysoka odporność odmiany VAM wynika z delecji całego genu eIF4E-1, pochodzącego od *N. sylvestris* oraz nadekspresji genu eIF4E-2, pochodzącego od *N. tomentosiformis*. Brak genu eIF4E-1 uniemożliwia połączenie się wirusowego białka VPg z eukariotycznym czynnikiem inicjacji translacji, zaś gen eIF4E-2 koduje białko, z którym wirus tworzy niefunkcjonalne połączenia. Zaprezentowana powyżej odporność na PVY warunkowana recesywnym genem *va* jest najczęściej stosowana w hodowli. Niestety nie zapewnia ona pełnej immunii na wszystkie izolaty PVY. Co więcej, odmiany uznawane za odporne mogą zostać porażone przez zjadliwe izolaty PVY.

Wyniki badań Depty i in. (2020) pozwoliły wyodrębnić grupę pięciu odmian, określanych jako tolerancyjne, które wykazywały tylko przejaśnienia nerwów i plamy chlorotyczne, a ich wzrost i rozwój był zbliżony do roślin zdrowych, mimo że wirus był obecny w tkankach. Cechą charakterystyczną tych obiektów był brak nekroz niezależnie od zastosowanego izolatu PVY. Jednocześnie pod kątem molekularnym wykazano obecność genu podatności *Va*. Spośród 163 odmian badanych przez Julio i in. (2015) również zidentyfikowano 10, które posiadały cechy tolerancji. Badania Michela i in. (2018) wskazują, że cecha ta jest warunkowana przez recesywny gen *NtTPNI* (*Nicotiana tabacum* Tolerance

to PVY-induced Necrosis 1). Jest on zlokalizowany na chromosomie 13 i powstał w wyniku mutacji punktowej w pozycji 497 tegoż genu.

Badania molekularne (Depta i in., 2020) wykazały obecność genu *Va* w odmianach podatnych, które reagowały nekrozami nerwów na wszystkie zastosowane izolaty PVY. Gen ten wykryto również w odmianie Węgierski Ogrodowy, którego reakcja na PVY była zróżnicowana. Odmiana ta była odporna na słaby izolat IUNG 23, zaś na izolat średni IUNG 17 reagowała wystąpieniem cech tolerancji w postaci plam chlorotycznych i przejaśnień nerwów. Natomiast izolaty silne spowodowały wystąpienie nekroz nerwów. Zróżnicowanie reakcji odpornościowej w zależności od izolatu PVY może sugerować, że odporność odmiany Węgierski Ogrodowy ma podłoże genetyczne inne niż gen *va*, przez co odmiana ta ze względu na swój unikalny charakter może być cennym źródłem odporności w hodowli tytoniu.

Trwałość odporności typu *va* zależy od wielkości delecji i izolatu PVY (Julio i in., 2015; Michel i in. 2019). Alternatywnym źródłem odporności jest wykorzystanie tolerancji, która co prawda nie chroni przed porażeniem, gdyż wirus jest obecny w roślinie, ale słabe objawy chorobowe pozwalają uzyskać stosunkowo dobry plon. Wyniki badań będących przedmiotem publikacji „Zróżnicowanie reakcji odpornościowej wybranych odmian tytoniu (*Nicotiana tabacum*) w zależności od użytego izolatu wirusa Y ziemniaka (PVY)” (Depta i in., 2020), umożliwiając ocenę trwałości odporności wybranych polskich odmian posiadających recesywny gen *va*, jak również pozwalają wytypować odmiany tolerancyjne, które mogą stanowić komponenty w hodowli.

Wykorzystanie odmian *Nicotiana tabacum* jako źródła genów odporności na PVY jest często niewystarczające ze względu na wzrost zagrożenia zjadliwymi izolatami PVY, które przełamują odporność typu *va*. Cennym źródłem odporności na różne patogeny, w tym PVY są gatunki należące do rodzaju *Nicotiana*. Z tego powodu przeprowadzono ocenę odporności dzikich gatunków tytoniu na różne izolaty PVY, a jej wyniki były przedmiotem publikacji „Resistance of wild *Nicotiana* species to different PVY isolates” (Doroszevska i Depta, 2011). Uzupełnieniem tych badań była ocena odporności stosunkowo niedawno odkrytego gatunku *Nicotiana mutabilis*, które zostały przedstawione w pracy pt. „Resistance Response of the Recently Discovered Species *Nicotiana mutabilis* to *Potato virus Y* (PVY) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) Compared to Other Sources of Resistance” (Depta i in., 2021). W obrębie badanych obiektów trzy gatunki: *Nicotiana raimondii*, *N. knightiana* oraz *N. africana* wykazywały immunię na wszystkie zastosowane izolaty PVY (Doroszevska i Depta, 2011). Wcześniejsze badania Sieverta (1972) oraz Głazewskiej (1977) również wskazują

*N. raimondii* i *N. knightiana* jako gatunki odporne na PVY. Natomiast zastosowanie amerykańskich izolatów PVY<sup>MM</sup> spowodowało pojawienie się zmian mozaikowych u gatunku *N. knightiana* (Burk i in., 1982). Prace hodowlane z wykorzystaniem *N. knightiana* i *N. raimondii* w celu przeniesienia odporności na PVY do tytoniu uprawnego prowadził Berbec (1987). Jednakże w wyniku dużej niestabilności genetycznej uzyskane obiekty mieszańcowe charakteryzowały się całkowicie nieżywotnym pyłkiem.

Immunia gatunku *N. africana* została potwierdzona we wcześniejszych badaniach z użyciem izolatów PVY o zróżnicowanej zjadliwości (Lucas i in., 1980; Doroszevska i Chrzanowska, 2001; Doroszevska, 2004; Doroszevska i Czubacka, 2008). W związku z tym podjęto prace hodowlane mające na celu przeniesienie odporności na PVY od *N. africana* do *N. tabacum*. Uzyskana przez Wersmanna (1992), w wyniku krzyżowania podatnej odmiany tytoniu McNair 944 i dzikiego gatunku *N. africana*, linia addycyjna NC152 posiadała parę homologicznych chromosomów od *N. africana* i wykazywała tylko częściową ochronę na PVY. Linia ta stanowiła komponent do dalszych krzyżowań z podatną odmianą Petit Havana, w wyniku których uzyskano w pokoleniu BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> obiekty odporne na izolat PVY NN (Lewis, 2005). Dalsze krzyżowania z podatną odmianą K326 pozwoliły uzyskać linie o zróżnicowanej odporności, w zależności od zastosowanego izolatu PVY (Lewis, 2007), a cecha ta była częściowo dominująca (Lewis, 2005). Doroszevska (2010) wykonała krzyżowanie pomiędzy podatną odmianą BP-210 i *N. africana* jako rodzicem ojcowskim. Uzyskana w wyniku tych prac linia BPA była tolerancyjna, o czym świadczyły słabe objawy chorobowe w postaci przejaśnień nerwów i plam chlorotycznych połączone z całkowitym brakiem nekroz, nawet po zastosowaniu silnie zjadliwych izolatów PVY<sup>NTN</sup> (Doroszevska i Czubacka, 2008; Doroszevska 2010; Korbecka-Glinka i in., 2017b). Odporność linii BPA ma charakter recesywny (Korbecka i in., 2017a), przy czym linia ta posiada jednocześnie gen podatności *Va*, co zostało potwierdzone w wyniku badań molekularnych z użyciem markera S10760 (Korbecka-Glinka i in., 2017b). Prezentowane powyżej prace dotyczyły wykorzystania odmian podatnych tytoniu w tworzeniu linii hodowlanych z *N. africana*. Depta i Doroszevska (2019) użyły do krzyżowania z *N. africana* dwie odporne odmiany *N. tabacum*: VAM i Wiślica posiadające recesywny gen *va*, których formy mieszańcowe są przedmiotem aktualnych badań w kierunku odporności na PVY. Ze względu na dużą odległość filogenetyczną, uzyskane mieszańce *N. tabacum* x *N. africana*, wykazywały barierę krzyżowalności w postaci zamierania siewek mieszańcowych, co było spowodowane brązowaniem systemu korzeniowego (Tezuka i in., 2010). Z tego powodu konieczne było zastosowanie kultur *in vitro*, które pozwoliły uzyskać żywotne mieszańce. Było to możliwe



poprzez organogenezę liścieni i regenerację roślin z wykorzystaniem odpowiednich pożywek (Doroszevska, 1994; Depta i Doroszevska, 2019). Kolejnym problemem była niepłodność pokolenia amfihaploidalnego spowodowana niską koniugacją chromosomów. Uzyskanie form płodnych było możliwe poprzez spontaniczne podwojenie liczby chromosomów w wyniku wydłużonego czasu kultur tkankowych (Doroszevska i Berbeć, 2000) lub z wykorzystaniem kultury rdzeni (Depta i Doroszevska, 2019). W wyniku prowadzonych prac hodowlanych nie udało się do tej pory osiągnąć immunii w mieszańcach uzyskanych w wyniku krzyżowania *N. tabacum* x *N. africana*. Wytlumaczeniem takiego stanu rzeczy może być wielogenowy charakter odporności na PVY u *N. africana* lub wpływ czynników genetycznych pochodzących od *N. tabacum* (Lewis, 2005; Doroszevska, 2007).

Pozostałe obiekty należące do rodzaju *Nicotiana* wykazują zróżnicowaną reakcję odpornościową w zależności od gatunku i zastosowanego izolatu PVY. Wysoką odporność posiada gatunek *N. glauca* (Sievert, 1972; Głazewska, 1977), jednak w badaniach Doroszevskiej i Depty (2011) tylko forma tetraploidalna tego gatunku okazała się odporna na wszystkie użyte izolaty PVY. Tymczasem forma diploidalna została porażona przez izolat PVY<sup>NZ</sup>, przy czym nie były obserwowane objawy chorobowe, ale obecność wirusa została wykazana na podstawie testów DAS-ELISA. Podobna sytuacja dotyczyła *N. benavidesii*, gdzie jedynie izolat PVY<sup>NZ</sup> spowodował wystąpienie chlorotycznych pierścieni. Podjęta próba krzyżowania tetraploidanej formy *N. tabacum* cv. BP 210 z *N. benavidesii* pozwoliła uzyskać częściowo płodne formy seskwidiploidalne. Uzyskane w wyniku samozapylenia linie mieszańcowe kolejnych pokoleń charakteryzowały się odpornością na PVY (Berbeć i Głazewska, 1988). Nieco mniejszą odporność, bo na trzy z sześciu zastosowanych izolatów, posiadały dwa gatunki z sekcji *Paniculatae* (*N. solanifolia*, *N. cordifolia*), dwa gatunki z sekcji *Tomentosae* (*N. otophora*, *N. setcheli*) oraz jeden gatunek z sekcji *Noctiflorae* (*N. petuniodes*) (Doroszevska i Depta, 2011). W badaniach Sieverta (1972), z wykorzystaniem dwóch izolatów PVY *N. solanifolia* i *N. cordifolia* okazały się podatne. Jednocześnie uznane wcześniej za odporne gatunki *N. thyrsoflora* (Sievert, 1972) i *N. paniculata* (Głazewska, 1977) w badaniach Doroszevskiej i Depty (2011) okazały się podatne na sześć izolatów. Dużym zróżnicowaniem odporności na PVY charakteryzowały się odmiany *N. rustica*, spośród których *N. rustica* var. *brasilica* zachowała odporność na trzy izolaty, *N. rustica* var. *pumila* na dwa, a *N. rustica* var. *neuchestii* na jeden. Objawy chorobowe na pozostałych odmianach *N. rustica* obejmowały głównie przejaśnienia nerwów i plamy chlorotyczne.

Spośród badanych obiektów *Nicotiana* (Doroszevska i Depta, 2011) zidentyfikowano 26 gatunków, które reagowały na wszystkie zastosowane izolaty PVY w postaci słabych

objawów chorobowych, co świadczy o ich tolerancji. Do gatunków tolerancyjnych należy również stosunkowo niedawno odkryty gatunek *N. mutabilis* oraz gatunki pokrewne z sekcji *Alatae*: *N. alata* i *N. forgetiana*, u których nie wystąpiły nekrozy nerwów, a jedynie słabe objawy chorobowe po zastosowaniu dwóch izolatów PVY<sup>NW</sup> i PVY<sup>NTN</sup> (Depta i in., 2021). Cardin i Moury (2008) przebadali 30 roślin *N. mutabilis* przy użyciu izolatu PVY<sup>C</sup>, na który gatunek ten zareagował również w postaci zmian mozaikowych i przejaśnień nerwów na liściach. Badania molekularne *N. mutabilis*, *N. alata* i *N. forgetiana* wykazały obecność markera Nsyl-elf4E1, co oznacza że gatunki te nie posiadają genu podatności na PVY (Depta i in., 2021). Taki wynik wskazuje na inne podłoże genetyczne tolerancji dzikich gatunków w porównaniu do tolerancji odmian uprawnych *N. tabacum*, u których amplifikowany jest marker związany z podatnością (Michel i in., 2018; Depta i in. 2020).

## 7.2. Ocena odporności na TSWV w obrębie rodzaju *Nicotiana*

Dużym zagrożeniem na plantacjach tytoniu jest wirus brązowej plamistości pomidora, który może spowodować całkowite zniszczenie plantacji, szczególnie, gdy porażenie dotknie młode rośliny w fazie 5 - 10 liści (Opoka, 1974). Wektorem TSWV jest wciornastek tytoniowy i w tym przypadku zalecane jest stosowanie ochrony chemicznej przez cały sezon wegetacyjny, by ograniczyć populację tego owada. Niestety działania te nie pomogą, jeśli roślina została już zainfekowana. Ponadto wszystkie uprawiane odmiany komercyjne są w różnym stopniu podatne na TSWV, gdyż w obrębie gatunku *Nicotiana tabacum* nie występuje odporność na tego wirusa (Opoka, 1974; Laskowska, 2008). Ze względu na jego dużą szkodliwość bardzo ważne jest prowadzenie hodowli odpornościowej poprzedzonej wiedzą na temat źródeł odporności. Dlatego też przeprowadzono badania obiektów *Nicotiana* pod względem odporności na TSWV w połączeniu z wykorzystaniem SCAR markerów opracowanych przez Moona i Nicholsona (2007). Badania stanowiły przedmiot pracy „A survey of *Nicotiana* germplasm for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)” (Laskowska i in., 2013), gdzie wykazano zróżnicowaną reakcję odporności na TSWV. Ocenę 24 gatunków należących do rodzaju *Nicotiana* wykonał wcześniej Opoka (1969) i Jankowski (1980), ale ich badania były prowadzone jedynie w warunkach silnej presji TSWV w doświadczeniu polowym. Według tych badań do gatunków odpornych na TSWV należały *N. alata*, *N. glauca* i *N. noctiflora*, zaś *Nicotiana x sanderae* była słabo podatna. Jako gatunki odporne wymieniano również *N. langsdorfii*, *N. longiflora*, *N. trigonophylla* (*N. obtusifolia*) i *N. palmerii*. Gatunki określone jako średnio podatne to

*N. tomentosiformis*, *N. debneyi*, *N. exigua*, *N. longiflora* i *N. megalosiphon*. Natomiast silnie podatne okazały się *N. acuminata*, *N. bigelovii*, *N. excelsior*, *N. glutinosa*, *N. maritima*, *N. miersii*, *N. paniculata*, *N. pauciflora*, *N. plumbaginifolia*, *N. repanda*, *N. rotundifolia*, *N. sylvestris* i *N. suaveolens* (Opoka, 1969). Obserwacje Gajosa (1978) wykazały odporność trzech gatunków na TSWV: *N. alata*, *N. affinis* i *N. langsdorfii*. Natomiast w badaniach Laskowskiej i in. (2013) jedynie *N. alata* i *Nicotiana x sanderae* zostały uznane za odporne na TSWV, zaś pozostałe gatunki były w różnym stopniu podatne. Słabe objawy chorobowe, tylko w postaci przejaśnień nerwów i plam chlorotycznych, wystąpiły u gatunków *N. petunioides*, *N. benavidesii*, *N. velutina*, *N. otophora*, *N. setchellii*, *N. obtusifolia*, *N. palmerii*, *N. arentsii* i *N. wigandioides*. Pozostałe 71 gatunków wykazało silniejsze objawy infekcji, które prowadziły do skarłowacenia, a nawet zamierania roślin. Rozbieżność w wynikach dotyczących odporności na TSWV jest spowodowana zarówno odmiennymi sposobami inokulacji, jak i zastosowanymi metodami identyfikacji wirusa w roślinach (Opoka, 1969; Jankowski, 1980; Gajos, 1978, Laskowska, 2013). Zróżnicowanie w ocenie odporności niektórych gatunków może również być związane z tempem wzrostu tych obiektów. Zaobserwowano, że dla gatunków wieloletnich rosnących powoli, objawy porażenia są słabsze (Laskowska, 2013). Parella i in. (2003) wymieniają szczegółową listę gatunków podatnych na TSWV należących do różnych rodzin botanicznych, w tym 60 gatunków należących do rodzaju *Nicotiana*. Lista ta obejmuje 7 obiektów nie będących przedmiotem badań Laskowskiej i in. (2013): *Nicotiana x calyciflora*, *N. clevelandii*, *N. cycliflora*, *Nicotiana x edwardsomii*, *N. fragrans*, *N. bonariensis* i *N. tomentosa*. Natomiast w pracy Parelli i in. (2003) brakuje informacji o 10 podatnych gatunkach, o których pisze Laskowska i in. (2013). Uzupełnieniem tego zagadnienia były badania w kierunku odporności na TSWV gatunku *N. mutabilis*, który podobnie jak *N. alata*, należy do sekcji *Alatae*. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w pracy pt. „Resistance Response of the Recently Discovered Species *Nicotiana mutabilis* to *Potato virus Y* (PVY) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) Compared to Other Sources of Resistance” (Depta i in., 2021). Wskazują one, że *N. mutabilis* reaguje nadwrażliwością na inokulację TSWV, przy czym dla części badanych roślin może dochodzić do porażenia systemicznego. W pierwszym terminie badań, po 4 tygodniach od inokulacji, dla 39 roślin z 40 badanych wystąpiła reakcja nadwrażliwości na dolnych liściach, dla 30 roślin na liściach środkowych i dla 10 na liściach górnych. W drugim terminie, po 8 tygodniach od inokulacji, liście środkowe były porażone u 31 roślin, a liście górne u 5 roślin. Natomiast po 4 miesiącach od inokulacji u 12 roślin wystąpiły objawy porażenia na górnych liściach, co świadczy o tym, że infekcja systemiczna

może wystąpić w długim czasie po inokulacji. Badania Depty i in. (2021) to pierwsze doniesienie dotyczące odporności *N. mutabilis* na TSWV. Występująca dla tego gatunku reakcja nadwrażliwości po inokulacji TSWV może być wskazaniem do wykorzystania go w pracach hodowlanych.

Wyniki wielu autorów pokazują jednoznacznie, że gatunkami odpornymi na TSWV, u których występuje reakcja nadwrażliwości, są *N. alata* i *Nicotiana x sanderae* (Opoka, 1969; Jankowski, 1980; Gajos, 1978; Laskowska i in., 2013; Depta i in., 2021). Jednakże szczegółowe badania kilku populacji tych dwóch obiektów (Laskowska i in., 2013) ujawniają możliwość wystąpienia systemicznej reakcji nadwrażliwości (SHR) na części badanych roślin danej populacji. Spośród siedmiu populacji *N. alata*, tylko u dwóch wszystkie rośliny reagowały jedynie reakcją nadwrażliwości (HR), natomiast u pozostałych TSWV spowodował wystąpienie systemicznej reakcji nadwrażliwości, która wahała się w zakresie 6,3 - 50% danej populacji. Podobnie jedna populacja *Nicotiana x sanderae* była całkowicie odporna, a trzy zostały częściowo porażone w zakresie 16,7 - 50%. Brak całkowitej odporności może być związany z brakiem pełnej homozygotyczności tych dwóch obiektów, ze względu na ich samoniezhodność. Podobne zjawisko występowania SHR w miejsce HR jest dość częste w interakcjach awirulentnych wirusów z odpornymi gatunkami. Mandal i in. (2002) zaobserwował SHR u 17,6 - 46,7% roślin *Arachis hypogaea* 'C11-2-39', u których początkowo wystąpiła HR. Gatunek *N. forgetiana*, blisko spokrewniony z *N. alata*, po inokulacji TSWV wykazywał początkowo reakcję nadwrażliwości. Jednakże z czasem dla wszystkich badanych roślin tego gatunku rozwijały się objawy systemiczne (Laskowska i in., 2013; Depta i in., 2021).

Ze względu na duże straty spowodowane TSWV podejmowane były liczne próby przeniesienia odporności z *N. alata* do *N. tabacum*. Jednakże uzyskanie mieszańca pomiędzy tymi dwoma gatunkami jest trudne ze względu na brak homologii chromosomów, wynikających z dużej odległości filogenetycznej (Goodspeed, 1954).

Prace mające na celu skrzyżowanie gatunku *N. alata* z *N. tabacum* podjął Gajos (1976). Uzyskane w procesie hodowlanym rośliny amfihaploidalne poddano działaniu kolchicyny, a otrzymaną w ten sposób amfidiploidalną roślinę o kwiatach męskopłodnych zapyłano wstecznie pyłkiem tytoniu szlachetnego. Dzięki temu uzyskano rośliny seskwidiploidalne BC<sub>1</sub>, które wykazywały reakcję nadwrażliwości po inokulacji TSWV. W dalszych pracach Gajos (1979) zastosował gatunek pomostowy, jakim był *Nicotiana otophora* i uzyskał mieszańce, które mogły być wstecznie krzyżowane z tytoniem, a następnie poddawane samozapyleniu. Ocena odporności mieszańców na TSWV w poszczególnych

pokoleniach była prowadzona za pomocą sztucznej inokulacji, a uzyskane proporcje rozszczepień na rośliny odporne i podatne świadczyły o dominującym charakterze genu odporności na TSWV (Gajos, 1981). Wynikiem prac Gajosa (1988) było uzyskanie odmiany w typie papierosowym ciemnym Polalta oraz odmiany w typie papierosowym jasnym Wiktorja (1993). Prace nad uzyskaniem mieszańca z *N. alata* prowadził również Berbec (1987), który do krzyżówek zastosował odmianę tytoniu Nadwiślański Mały w dwóch formach: di- i tetraploidalnej. Amfihaploidy powstałe w wyniku krzyżowania formy diploidalnej *N. tabacum* z *N. alata* były całkowicie bezpłodne. Z kolei po zastosowaniu formy tetraploidalnej tytoniu uzyskano seskwidiploidy, które również wykazywały niską płodność, ale kolejne krzyżówki wsteczne pozwoliły na wzrost stopnia żywotności.

Badania Polalty pod kątem odporności na TSWV wykazały reakcję nadwrażliwości u wszystkich badanych roślin (Yancheva, 1990; Laskowska, 2013). Niestety krzyżowanie wsteczne Polalty z podatną odmianą Wiślica spowodowało uzyskanie roślin mieszańcowych o silnych deformacjach morfologicznych w postaci wydłużonych lub taśmowatych liściach z grubymi nerwami, a także guzy na kwiatostanach i karłowatość roślin (Laskowska i Berbec, 2010). Prace hodowlane pomiędzy odmianą K326 i Polaltą potwierdziły sprzężenie deformacji morfologicznych z cechą odporności (Moon i Nicholson, 2007). Dopiero zastosowanie procesu androgenezy i regeneracji podwojonych haploidów w warunkach kultur *in vitro* pozwoliło wyselekcjonować trzy odporne linie PW o dość dobrej morfologii (Laskowska i Berbec, 2010). Wybrana linia PW została skrzyżowana z odporną na *Th. basicola* linią WGL3. Dalsze prace hodowlane doprowadziły do uzyskania linii o średnim stopniu deformacji odpornych zarówno na TSWV jak i na *Th. basicola* (Trojak-Goluch i in., 2011).

Dużym wsparciem w hodowli są markery molekularne. W pracach będących przedmiotem rozprawy doktorskiej geny związane z odpornością na TSWV identyfikowano dzięki markerom opracowanym przez Moona i Nicholsona (2007). Zastosowane markery wykrywano w obiektach, u których wystąpiła reakcja nadwrażliwości (*N. alata*, *N. sanderae*, *N. mutabilis*, *N. tabacum* cv. Polalta) lub reakcja systemicznej nadwrażliwości (*N. forgetiana*). W obiektach podatnych na TSWV nie amplifikowano tych markerów. Duże zróżnicowanie odporności wykazano w obrębie badanych roślin odmiany Wiktorja, gdzie tylko 4 spośród 19 wykazały reakcję nadwrażliwości i w tych obiektach amplifikowano markery związane z czynnikiem odporności, a pozostałe rośliny były podatne (Laskowska i in., 2013; Depta i in., 2021).

### 7.3. Ocena odporności na TMV w obrębie rodzaju *Nicotiana*

Ocena odporności na wirus mozaiki tytoniu będąca przedmiotem pracy „Reaction of *Nicotiana* species and cultivars of tobacco to *Tobacco Mosaic Virus* and detection of the *N* gene that confers hypersensitive resistance” wykazała duże zróżnicowanie wśród obiektów z rodzaju *Nicotiana* (Depta i in., 2018). Uzyskane wyniki pozwoliły wyodrębnić cztery grupy. Największą grupę obejmującą przede wszystkim odmiany *N. tabacum*, stanowiły obiekty podatne, u których zaobserwowano mozaikowe przebarwienia, a wirus był obecny w tkankach roślin. Do grupy drugiej należały obiekty tolerancyjne, u których nie zaobserwowano objawów chorobowych w temperaturze 22°C, ale wzrost temperatury do 30°C spowodował wystąpienie zmian mozaikowych, jak również zahamowanie wzrostu i żółknięcie roślin. Jednocześnie zastosowane testy DAS-ELISA wskazują na obecność wirusa w roślinach niezależnie od temperatury. Do tej grupy należała kolumbijska odmiana Ambalema i trzy dzikie gatunki: *N. glauca*, *N. wigandioides* i *N. africana*. Informacje dotyczące tolerancji odmiany Ambalema wskazują, że cecha ta jest warunkowana przez dwa recesywne geny (*mt1* i *mt2*) i kilka genów modyfikujących (Nolla i Roque, 1933). Z tego powodu trudno ją wykorzystać w programach hodowlanych (Valleau, 1952). Reakcję bezobjawową po inokulacji TMV zaobserwowano już wcześniej u kilku dzikich gatunków: *N. glauca* i *N. tomentosiformis* (Valleau, 1952) oraz *N. wigandioides* (Holmes, 1946).

Trzecia grupa obejmowała obiekty wykazujące reakcję nadwrażliwości w postaci nekrotycznych plamek na dolnych liściach. Dane literaturowe wskazywały gatunki reagujące reakcją nadwrażliwości na TMV i obejmowały: *N. glutinosa*, *N. repanda*, *N. gossei*, *N. rustica*, *N. langsdorfii*, *N. benthamiana*, *N. maritima*, *N. sanderae*, *N. velutina*, *N. acuminata*, *N. goodspeedii*, *N. forgetian*, *N. nesophila* i *N. stoctonii* (Holmes, 1929; Valleau, 1952; Burk i Heggstad, 1966; Gwynn, 1977; Yuan i in., 2015). W obrębie odmian uprawnych *N. tabacum* również były prowadzone badania nad odpornością na TMV. Większość przebadanych odmian była podatna na TMV i reagowała zmianami mozaikowymi (Holmes, 1938; Lucas, 1975; Trancheva 2005; Huang i in., 2013; Chen i in., 2014; ). Lucas (1975) jako odmiany z odpornością typu nadwrażliwości wymienia: Sota 27, Diubek 566, Newrokop 261 i Immunnyj 580. Wyniki prac Tranchevy (2005) także wskazują odmiany Diubek 566, Newrokop 261 oraz Immunnyj 580. Spośród 22 odmian badanych przez Chen i in. (2014) tylko Coker 86 i Jiyan 5 uznano za odporne. Jednakże w przedstawionych pracach nie ma pełnych informacji co do metod inokulacji i zastosowanego izolatu TMV. Natomiast badania Depty i in. (2018) wskazują, że rodzaj odporności typu nadwrażliwości występuje

u 7 gatunków z rodzaju *Nicotiana* (*N. glutinosa*, *N. maritima*, *N. goodspeedii*, *N. repanda*, *N. benthamiana*, *N. langsdorfii* i *N. gosseii*) oraz u 14 odmian tytoniu uprawnego, w tym u wymienianych wcześniej odmian: Sota 27, Diubek 566, Newrokop 261 i Immunnyj 580.

Badania molekularne przy użyciu primerów E i N (Lewis, 2005) wykazały, że wszystkie badane przez Deptę i in. (2018) odmiany tytoniu posiadają odporność na TMV warunkowaną genem *N*, pochodzącym od *N. glutinosa*. Jest to pojedynczy, dominujący gen odpowiedzialny za reakcję nadwrażliwości (Holmes, 1938; Gerstel, 1943). Natomiast w gatunkach z rodzaju *Nicotiana* wykazujących reakcję HR nie identyfikowano tego genu. Wynika to z faktu, że posiadają one geny homologiczne do genu *N*, które nie są wykrywane za pomocą primerów zastosowanych w badaniach (Depta i in., 2018). Według Stange i in. (2004) duża część gatunków z rodzaju *Nicotiana* posiada geny homologiczne *NH*, które mają 82,6% identyczności nukleotydowej z genem *N*, zaś Zhang i in. (2009) opisali homologiczny gen *CN*, pochodzący od *N. rustica*, który był zgodny z genem *N* w 93,63%.

Zastosowane przez Deptę i in. (2018) dwa zakresy temperatury, pozwoliły ocenić trwałość odporności na TMV. Reakcja odpornościowa obiektów zawierających gen *N*, jak również część gatunków z genami homologicznymi, była zależna od temperatury. W temperaturze powyżej 28°C następowało namnażanie i przemieszczanie wirusa do wyższych partii rośliny, co skutkowało systemiczną reakcją nekrotyczną (SNR). Obserwowana odporność warunkowana genem *N* jest prawdopodobnie związana z obecnością termowrażliwych białek (IVR), które hamują replikację wirusa (Gera i in., 1993). Gatunek *N. rustica* wykazywał systemiczną reakcję nekrotyczną w obydwu zakresach temperatury. Ze względu na ocieplenie klimatu, a co za tym idzie wzrost występowania TMV na świecie, stosowanie odporności warunkowanej genem *N* może być zawodne. Wyniki uzyskanych badań (Depta i in., 2018) wykazały, że odporność gatunku *N. gosseii* jest niezależna od temperatury, zatem może on stanowić bardziej skuteczne źródło odporności na TMV.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej pozwoliły poszerzyć i usystematyzować wiedzę dotyczącą źródeł odporności na choroby wirusowe w rodzaju *Nicotiana*. Jest to jedyne tak szerokie opracowanie w tym zakresie. Stanowi doskonałą bazę informacji umożliwiającą odpowiedni dobór obiektów do krzyżowania w hodowli odpornościowej tytoniu.

## 8. Podsumowanie i wnioski

1. Przeprowadzone badania zasobów genowych rodzaju *Nicotiana* wykazały duże zróżnicowanie odporności gatunków w zależności od użytego wirusa, a w przypadku PVY również od konkretnego izolatu.
2. Całkowitą odporność dzikich gatunków *Nicotiana* na wszystkie badane izolaty PVY stwierdzono u: *N. glauca*, *N. raimondii*, *N. knightiana* i *N. africana*, a 26 gatunków wykazało objawy tolerancji. Pozostałe obiekty charakteryzowały się zróżnicowaną reakcją odpornościową w zależności od użytego izolatu.
3. Badania molekularne wykazały, że w obrębie 25 odmian tytoniu u 9 stwierdzono obecność genu podatności *Va*, zaś w pozostałych 16 nie stwierdzono jego obecności, co wskazuje, że odmiany te posiadają delecję w obrębie genu podatności warunkującą odporność określaną jako odporność typu *va*.
4. Odmiany z odpornością typu *va* wykazywały zróżnicowany poziom reakcji na infekcję PVY, co może świadczyć o różnej długości delecji w genie podatności. Najwyższą odpornością cechowała się odmiana VAM.
5. Wśród odmian uprawnych wyselekcjonowano odmiany tolerancyjne, które reagowały na porażenie PVY przejaśnieniami nerwów i plamami chlorotycznymi, ale nie wykazywały reakcji nekrotycznych. Jednocześnie posiadały one gen podatności *Va*, co może świadczyć o innym podłożu genetycznym tolerancji niż odporność typu *va*.
6. Odmiana Węgierski Ogrodowy, mimo obecności genu podatności *Va*, nie uległa porażeniu izolatem określanym jako słaby, a na izolat średni zareagowała jedynie tolerancją. Izolaty silne spowodowały u niej nekrozę nerwów. Można przypuszczać, że odmiana ta posiada inny rodzaj odporności niż pozostałe badane odmiany.
7. Badania obiektów w kierunku odporności na wirusa brązowej plamistości pomidora na tytoniu wskazują, że odporność typu nadwrażliwości ma miejsce w gatunkach *N. alata* i *N. forgetiana*, mieszańcu *Nicotiana x sanderae* i dwóch odmianach tytoniu uprawnego (Polalta i Wiktoria). W przypadku *N. alata* odporność ta jest zróżnicowana i w obrębie kilku badanych populacji część roślin uległo porażeniu systemicznemu.
8. Reakcja odpornościowa na TSWV pozostałych obiektów kolekcyjnych była zróżnicowana. Objawy tolerancyjne zaobserwowano u 9 dzikich gatunków, ale znaczna część, bo aż 71 obiektów wykazało znacznie silniejsze objawy infekcji.
9. Prezentowane po raz pierwszy wyniki odporności stosunkowo niedawno odkrytego gatunku *Nicotiana mutabilis* wskazują, że jest on tolerancyjny na PVY oraz wykazuje reakcję nadwrażliwości w stosunku do TSWV.
10. Odporność na wirusa mozaiki tytoniu badanych odmian *Nicotiana tabacum* warunkowana jest przez gen *N* pochodzący z gatunku *N. glutinosa*. Przyjmuje ona postać nadwrażliwości i jest zależna od temperatury.



11. W rodzaju *Nicotiana* alternatywnym źródłem odporności na TMV jest gatunek *N. glauca*, który nie posiada genu *N*, a wykazuje reakcję nadwrażliwości. Odporność tego gatunku jest niezależna od temperatury.
12. Obiekty odporne na poszczególne wirusy stanowią cenne źródła genów dla hodowli odpornościowej i dlatego mogą być przedmiotem dalszych badań.

## 9. Literatura

1. 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.
2. Berbeć A. 1987. Chromosome pairing and pollen fertility in the interspecific F<sub>1</sub> Hybrids *Nicotiana tabacum* L. x *N. benavidesii* Goodspeed, *N. knightiana* Goodspeed x *N. tabacum*, and *N. raimondii* Macbride x *N. tabacum*. *Genetica Polonica*, 28(3): 263-269.
3. Adams M.J., Lefkowitz E.J., King A.M.Q., Harrach B., Harrison R.L., Knowles N.J., Kropinski A.M., Krupovic M., Kuhn J.H., Mushegian A.R. i in. 2017. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.*, 162 (8): 2505–2538.
4. Augsten M., Burkowski Meyer P., Freitas L. B., Batista J. A. N., Stehmann J. R. 2022. *Nicotiana gandarela* (Solanaceae), a new species of 'tobacco' highly endangered from the Quadrilátero Ferrífero in Brazil. *PhytoKeys*, 190: 113-129.
5. Bakaheer N. 2020. Genetic Markers in Tobacco, Usage for Map Development, Diversity Studies, and Quantitative Trait Loci Analysis. *The Tobacco Plant Genome*, 3: 43-49.
6. Bally J., Marks C. E., Jung H., Jia F., Roden S., Cooper T., Newbiggin E., Waterhouse P. M. 2021. *Nicotiana paulineana*, a new Australian species in *Nicotiana* section *Suaveolentes*. *Australian Systematic*, 34, 477-484.
7. Berbeć A. 1987. Cytological study on *Nicotiana tabacum* L. cv. Nadwiślański Mały (2x and 4x) x *Nicotiana alata* Link et Otto hybrids. *Genetica Polonica*, Vol. 28, No.3: 251-262.
8. Berbeć A., Doroszevska T. 2020. The Use of *Nicotiana* Species in Tobacco Improvement. *The Tobacco Plant Genome*, 8: 101-146.
9. Berbeć A., Głazewska Z. 1988. Transfer of resistance to potato virus Y from *Nicotiana benavidesii* Goodspeed to *N. tabacum* L. *Genetica Polonica*, 29 (3-4): 323-333.
10. Berbeć A., Madej A. 2012. Obecna sytuacja i perspektywy uprawy tytoniu w Polsce na tle świata i Unii Europejskiej. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 31 (5): 51-67.
11. Burk L.G., Gooding G.V., Chaplin J.F. 1982. Reaction of *Nicotiana* species and cultivars or breeding lines of *Nicotiana tabacum* to three strains of potato virus Y. *Tobacco Science*, 28: 86-88.

12. Bindler G., Plieske J., Bakaher N., Gunduz I., Ivanov N., Van der Hoeven R., Ganal M., Donini. 2011. A high density genetic map of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from large scale microsatellite marker development. *Theor Appl Genet*, 123: 219–230.
13. Bindler G., Van der Hoeven R., Gunduz I., Pliske J., Ganal M., Rossi L., Gadani F., Donini P. 2007. A microsatellite marker based linkage map of tobacco. *Theor Appl Genet*, 114: 341–349.
14. Bland M. M., Matzinger D. F., Levings C. S. 1985. Comparison of the mitochondrial genome of *Nicotiana tabacum* with its progenitor species. *Theor Appl Genet*, 69: 535–541.
15. Bombarely A., Rosli H. G., Vrebalov J., Moffett P., Mueller L., Martin G. 2012. A Draft Genome Sequence of *Nicotiana benthamiana* to Enhance Molecular Plant - Microbe Biology Research. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 25: 1523–1530.
16. Brokmöller T., Ling Z., Li D., Gaquerel E., Baldwin I.T., Xu S. 2017. *Nicotiana attenuate* Data Hub (NaDH): an integrative platform for exploring genomic, transcriptomic and metabolomics data in wild tobacco. *BMC Genomics*, 18: 79.
17. Burbidge N. T. 1960. The Australian species of *Nicotiana* L. (*Solanaceae*). *Aust. J. Bot.*, 8: 342-380.
18. Burk L. G., Heggstad H. E. 1966. The genus *Nicotiana*: A source of resistance to diseases of cultivated tobacco. *Economic Botany*, 20 (1): 76-88.
19. Cardin L., Moury B. 2008. First Report of *Potato virus Y* in *Nicotiana glutabata* in France. *Plant Dis.* 92, 312.
20. Cauz-Santos L. A., Dodsworth S., Samuel R., Christenhusz M. J. M., Patel D., Shittu T., Jakob A., Paun O., Chase M. W. 2022. Genomic insights into species divergence in *Nicotiana benthamiana* and natural variation in *Rdr1* gene controlling viral susceptibility. *The Plant Journal*, 111: 7-18.
21. Chase M. W., Cauz-Santos L. A., Dodsworth S., Christenhusz M. J. M. 2022. Taxonomy of the Australian *Nicotiana benthamiana* complex (*Nicotiana* section *Suaveolentes*; *Solanaceae*): five species, four newly described, with distinct ranges and morphologies. *Australian Systematic Botany*, 35 (5): 345-363.
22. Chase M. W., Christenhusz M. J. M. 2018a. 883. NICOTIANA KARIJINI. *Curtis' Bot Mag.*, 35: 228–236.
23. Chase M. W., Christenhusz M. J. M. 2018b. 885. NICOTIANA GASCOYNICA. *Curtis' Bot Mag*, 35: 245–252.

24. Chase M. W., Christenhusz M. J. M. 2018c. 890. NICOTIANA BENTHAMIANA. Solanaceae Curtis's Bot Mag, 35 (3): 286-294.
25. Chase M. W., Christenhusz M. J. M. 2021a. 998. NICOTIANA PILA. Solanaceae. Curtis's Bot Mag, 38 (3): 394-404.
26. Chase M. W., Christenhusz M. J. M. 2021b. 994. NICOTIANA INSECTICIDA. Solanaceae. Curtis's Bot Mag, 38 (3): 350-364.
27. Chase M. W., Christenhusz M. J. M., Conran J.G., Dodsworth S., Medeiros Nollet, de Assis F., Felix L.P., Fay M. F. 2018a Unexpected diversity of Australian tobacco species (*Nicotiana* section *Suaveolentes*, Solanaceae). Curtis' Bot Mag, 35: 212–227.
28. Chase M. W., Conran J. G., Christenhusz M. J. M. 2018b. 884. NICOTIANA YANDINGA. Curtis' Bot Mag, 35: 237–244.
29. Chase M. W., Conran J. G., Christenhusz M. J. M. 2018c. 886. NICOTIANA FAUCICOLA. Curtis' Bot Mag, 35: 253–260.
30. Chase M. W., Dodsworth S., Christenhusz M. J. M. 2021a. 989. NICOTIANA WALPA. Solanaceae. Curtis's Bot Mag, 38 (3): 298-308.
31. Chase M. W., Fay M. F., M. J. M. Christenhusz. 2021b. 1000. NICOTIANA SALINA. *Suaveolens*. Curtis's Bot Mag, 38 (3): 416-424.
32. Chase M. W., Fay M. F., Nollet F., Christenhusz M. J. M. 2021c. 993. NICOTIANA NOTHA. Curtis's Bot Mag, 38(3): 340-349.
33. Chase M. W., Knapp S., Cauz-Santos L. A., Christenhusz M. J. M. 2021d. (2845) Proposal to conserve the name *Nicotiana benthamiana* (*N. suaveolens* var. *cordifolia*) (*Solanaceae*) with a conserved type. *Taxon*, 70 (5): 1146-1147.
34. Chase M. W., Knapp S., Cox A. V., Clarkson J. J., Butsko Y., Joseph J., Savolainen V., Parokony A. S. 2003. Molecular Systematics, GISH and the Origin of Hybrid Taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). *Ann Bot*, 92: 107-127.
35. Chase M. W., Palsson R. L., Christenhusz M. J. M. 2021e. 995. NICOTIANA HOSKINGII. Curtis's Bot Mag, 38 (3): 365-373.
36. Chase M. W., Przeslawski R. A., Falvey L. E., Fay M. F., Christenhusz J. J. M. 2021f. 997. NICOTIANA MURCHISONICA. Curtis's Bot Mag, 38 (3): 383-393.
37. Chrzanowska M. 1994. Differentiation of potato virus Y (PVY) isolates. *Phytopathologia Polonica*, 8: 15-20.
38. Clarkson J. R., Symon D. E. 1991. *Nicotiana wuttkei* (Solanaceae), a new species from north-eastern Queensland with an unusual chromosome number. *Austrobaileya*, 3(3): 389-392.

39. Clarkson J.J., Dodsworth S., Chase M.W. 2017. Time calibrated phylogenetic trees establish a lag between polyploidisation and diversification in *Nicotiana* (Solanaceae). *Plant Syst Evol*, 303: 1001–1012.
40. Clarkson J.J., Knapp S., Garcia V.F., Olmstead R.G., Leitch A.R., Chase M.W. 2004. Phylogenetic relationships in *Nicotiana* (Solanaceae) inferred from multiple plastid DNA regions. *Mol Phylogenet Evol*, 33: 75–90.
41. Clayton E.E., Smith H.H., Foster H.H. 1938. Mosaic resistance in *Nicotiana tabacum* L. *Phytopathology* 28: 286–288.
42. Crosslin J.M. 2013. PVY: An Old Enemy and a Continuing Challenge. *American Journal of Potato Research*, 90: 2-6.
43. Czubačka A. 2022. The Use of the Polish Germplasm Collection of *Nicotiana tabacum* in Research and Tobacco Breeding for Disease Resistance. *Agriculture*, 12, 1994
44. Czubačka A., Doroszeńska T. 2010. Estimating agronomic traits of transgenic tobacco lines. *Euphytica*, 172: 35-47.
45. Depta A., Doroszeńska T. 2019. Development and cytometric evaluation of interspecific F<sub>1</sub> hybrids *Nicotiana tabacum* x *N. africana*. *Polish Journal of Agronomy*, 38: 3-14.
46. Depta A., Kawka M., Kurska K., Doroszeńska T. 2012. Nowoczesne metody i techniki w ulepszaniu genotypów tytoniu dla produkcji rolniczej i poprawy jakości surowca. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 31(5): 69-131.
47. Dewey R.E., Xie J. 2013. Molecular genetics of alkaloid biosynthesis in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*, 94: 10–27.
48. Doroszeńska T. 2004. Krzyżowanie oddalone i transformacja genetyczna w uzyskiwaniu odporności tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) na wirusa Y ziemniaka (PVY). *Monografie i Rozprawy Naukowe, Puławy*, 9: 1-135.
49. Doroszeńska T. 1994. Przełamywanie barier nieżywotności i bezpłodności międzygatunkowych mieszańców *Nicotiana tabacum* × *Nicotiana africana* Merxm. metodą kultur tkankowych. *Prace Ogrodu Botanicznego PAN*, 5/6: 465-472.
50. Doroszeńska T., Berbeć A., Czarnecka D., Kawka M. 2013. *Diseases and Pests of Tobacco*; Institute of Soil Science and Plant Cultivation: Puławy, Poland.
51. Doroszeńska T., Berbeć A. 2000. Cytogenetical investigations of poliploid interspecific hybrids of *Nicotiana africana* with different cultivars of *N. tabacum*. *Journal of Genetics & Breeding*, 54: 77-82.

52. Doroszevska T., Chrzanowska M. 2001. Characterization of the main PVY resistance sources to different PVY strains. Inf. Bull. Join Meeting of the CORESTA, Agronomy & Phytopathology Study Groups. Cape Town, RPA, 60.
53. Doroszevska T., Czubacka A. 2008. Ocena odporności odmian i linii hodowlanych tytoniu na wirusa Y ziemniaka (PVY). Studia i Raporty IUNG-PIB, 13: 29-42.
54. Doroszevska T., Depta A., Czubacka A. 2009. Album gatunków z rodzaju *Nicotiana* / Album of *Nicotiana* species. Institute of Soil Science and Plant Cultivation. National Research Institute, Puławy.
55. 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.
56. Doroszevska T. 2007. Uzyskanie stabilnych linii hodowlanych tytoniu z czynnikami odporności na różne izolaty wirusa Y ziemniaka (PVY) od dzikiego gatunku *Nicotiana africana* Merxm. Biuletyn IHAR, 244: 273-287.
57. Doyle J. J., Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19: 11-15.
58. Drake J. W. 1993. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. Proceeding of the National Academy of Sciences of The United States of America (PNAS), 90: 4171-4175.
59. Edwards K.D., Fernandez-Pozo N., Drake-Stowe K., Humphry M., Evans A.D., Bombarely A., Allen F., Hurst R., White B., Kernodle S.P., Bromley J.R., Sanchez-Tamburrino J. P., Lewis R.S., Mueller L.A. 2017. A reference genome for *Nicotiana tabacum* enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency. BMC Genom, 18:448
60. Eich E. 2008. Solanaceae and Convolvulaceae: secondary metabolites: biosynthesis, chemotaxonomy, biological and economic significance (a handbook). Springer.
61. Francki R.I.B., Fauquet C.M., Knudson D.D., Brown F. 1991. Classification and Nomenclature of Viruses: Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch. Virol. 2, 1-450.
62. Głazewska Z. 1977. Odporność dzikich gatunków *Nicotiana* oraz odmian *N. tabacum* i *N. rustica* na nekrotyczne szczepy wirusa Y. Mat. XVII Sesji Nauk., IOR Poznań, s. 277-287.

63. Gajos Z. 1981. Inheritance of resistance to *Tomato spotted wilt virus* in interspecies hybrids of *Nicotiana tabacum* L. x *Nicotiana alata* Link. *Zeszyty Probl. Post. Nauk Rol.*, 244: 117-126.
64. Gajos Z. 1978. Podatność dwudziestu dzikich gatunków *Nicotiana* na zakażenie przez wirus brązowej plamistości pomidora (*Lycopersicum virus 3* Smith) w zależności od wieku roślin inokulowanych. *Biul. Centr. Lab. Przem. Tyton.* 1-2: 25-37.
65. Gajos Z. 1976. Z badań nad odpornością międzygatunkowych mieszańców *Nicotiana tabacum* L. x *Nicotiana alata* Link. na wirus brązowej plamistości pomidora (*Lycopersicum virus 3* Smith). *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 182: 83-88.
66. Gajos Z. 1979. Próby wykorzystania mieszańców *Nicotiana tabacum* L. × *Nicotiana otophora* Grizw hodowli tytoniu odpornego na *Perenospora tabacina* Adam (PT-2) i inne choroby. *Biuletyn Centralnego Laboratorium Przemysłu Tytoniowego*, 1-2: 11-24.
67. Gajos Z. 1987. Polalta, the first Polish tobacco variety resistant to *Tomato spotted wilt virus* was released for regional experimentation and propagation. *Wiad. Tytoniowe.* 31, 11–17.
68. Gajos Z. 1993. Virginia ZG-4 (Wiktoria)—A new tobacco variety resistant to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) and black root rot (*Thielaviopsis basicola* Ferr.). *Biul. CLPT*, 1–4, 5–19.
69. Gebhardt C. 2016. The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research. *Theor Appl Genet*, 129: 2281–2294.
70. Gera A., Tam Y., Teverovsky E., Loebenstein G. 1993. Enhanced tobacco mosaic virus production and suppressed synthesis of the inhibitor of virus replication in protoplasts and plants of local lesion responding cultivars exposed to 35°C. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 43: 299-306.
71. Goelet P., Lomonossoff G.P., Butler P.J.G., Akam M.E., Gait M.J. and Karn J. 1982. Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 79(19): 5818 – 5822.
72. Goodspeed T. H. 1954. The genus *Nicotiana*: origins, relationships and evolution of its species in the light of their distribution, morphology and cytogenetics. *Chron. Bot.* 161-536.
73. Gugerli P., Fries, P. 1983. Characterization of monoclonal antibodies to Potato virus Y and their use for virus detection. *J. Gen. Virol.* 64: 2471–2477.
74. Gwynn GR. 1977. Evaluation of tobacco mosaic virus resistant germ plasm. *Tobacco Research* 3: 89–94.

75. Hane D. C., Hamm P. B. 1999. Effects of Seedborne Potato Virus Y Infection in Two Potato Cultivars Expressing Mild Disease Symptoms. *Plant Disease*, 83(1): 43-45.
76. Hecht S. 2003. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3: 733-744.
77. Holmes F. O. 1938. Inheritance of resistance to tobacco mosaic disease in tobacco. *Phytopathol*, 28: 553–561.
78. Holmes F. O. 1929. Local lesions on tobacco mosaic. *Botanical Gazette*, 87: 39-55.
79. Holmes F. O. 1946. A comparison of the experimental host ranges of tobacco-etch and tobacco mosaic viruses. *Phytopathology*, 36: 643-657.
80. Ivancheva-Gabrovska T. 1978. Sources of resistance to *Tomato spotted wilt virus* and *Thrips tabaci* Lind. Spec. CORESTA Bull Symp. Sofia 96.
81. Jankowski F. 1980. Sources of resistance to TSWV (*Lycopersicum virus* 3) among uncultivated species of *Nicotiana* genus. *Biul CLPT* 1–2: 3–8.
82. 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.
83. Jones D. R. 2005. Plant viruses transmitted by thrips. *Eur J Plant Pathol*, 113:119–157.
84. Julio E., Cotucheau J., Decorps C., Volpatti R., Sentenac C., Candresse T., Dorlhac de Borne F. 2015. A Eucariotic Translation Initiation Factor 4E (eIF4E) is Responsible for the “va” Tobacco Recessive Resistance to Potyvirus. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 33: 609–623.
85. Korbecka-Glinka G., Czubacka 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.
86. Korbecka-Glinka G., Czubacka 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.
87. Kelly L. J., Leitch A. R., Clarkson J. J., Knapp S., Chase M. W. 2012. Reconstructing the complex evolutionary origin of wild allopolyploid tobaccos (*Nicotiana* section *Suaveolentes*). *Evolution*, 67-1: 80-94.
88. Kenton A., Parokony A. S., Gleba Y. Y., Bennett M. D. 1993. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *Mol. Gen. Genet.*, 1993, 240: 159-169



89. Khafizova G., Dobrynin P., Polev D., Matveeva T. 2018. *Nicotiana glauca* whole-genome investigation for cTDNA study. BMC Res Notes, 11:18.
90. Knapp S. 2020. Biodiversity of *Nicotiana* (Solanaceae). Ivanov i in. (eds), The Tobacco Plant Genome, Compendium of Plant Genomes, 21-41.
91. Knapp S., Chase M. W., Clarkson J. J. 2004. Nomenclatural changes and a new sectional classification in *Nicotiana* (Solanaceae) Taxon, 53 (1): 73-82.
92. Koelle G. 1958. Versucher zur Vererbung der Krankheitsresistenz bei Tabak. 2 Mitt. Eine Rippen-braune-resistente Virgin A Mutanten nach Anwendung künstlicher Mutations auslösung durch Röntgenstrahlen. Table Forsch. 24, 83–84.
93. Kostoff D. 1943. The cytogenetics of *Nicotiana*. State Printing House, Sofia.
94. Kovalenko A. G., Rud E. A., Strelyaeva N. I., Oleshchenko L. T. 1987. Responses of tobacco varieties, wild species and interspecies hybrids on artificial infection with *Tomato spotted wilt virus*. Mikrobiol. Zhurnal, 49: 85–89.
95. 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.
96. 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.
97. 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(1): 138-144.
98. Lewis R. S. 2005. Transfer of resistance to potato virus Y (PVY) from *Nicotiana africana* to *Nicotiana tabacum*: possible influence of tissue culture on the rate of introgression. Theoretical and Applied Genetics, 110: 678-687.
99. Lucas G. B., Gooding G. V., Sasser J. N., Gerstel D. U. 1980. Reaction of *Nicotiana africana* to black shank, Granville wilt, tobacco mosaic virus and potato virus Y. Tobacco Science, 24: 141-142.
100. Laskowska D. 2008. Charakterystyka groźnej choroby tytoniu – brązowej plamistości pomidora i rola wektora w jej przenoszeniu. Studia i Raporty IUNG-PIB, 13: 43-50.
101. Laskowska D., Berbeć A. 2010. TSWV resistance in DH lines of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from a hybrid between ‘Polalta’ and ‘Wiślica’. Plant Breed 129:731–733.

102. Lewis R. S. 2007. Evaluation of *Nicotiana tabacum* genotypes possessing *Nicotiana africana*-derived genetic tolerance to *Potato Virus Y*. *Crop Science*, 47: 1975-1984.
103. Lester R. N., Hawkes J.G. 2001. Solanaceae. In: Hanelt P and Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (eds) Mansfeld's encyclopedia of agricultural and horticultural crops (Except Ornamentals), vol 4. Springer, Berlin, pp 1790–1856
104. Lewis R. L. 2021. Long-Term Public Maintenance of *Nicotiana* Germplasm. *Nicotiana* Germplasm Collection Task Force. Final Report. CORESTA, November.
105. Lewis R. L., Nicholson J. S. 2007. Aspects of the evolution of *Nicotiana tabacum* L. and the status of the United States *Nicotiana* Germplasm Collection. *Genet Resour Crop Evol*, 54: 727-740.
106. Lewis R. S., Bowen S. W., Keogh M. R., Dewey R. E. 2010. Three nicotine demethylase genes mediate nornicotine accumulation in tobacco: functional characterization of the *CYP82E10* gene. *Phytochemistry*, 71: 1988-1998.
107. Lewis R. S. 2020. *Nicotiana tabacum* L.: Tobacco. In: Novak J., Blüthner WD. (eds) Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants. *Handbook of Plant Breeding*, 12: 345-375.
108. Lewis R. S., Milla S. R., Levin J. S. 2005. Molecular and genetic characterization of *Nicotiana glutinosa* L. chromosome segments in tobacco mosaic virus-resistant tobacco accessions. *Crop Science*, 45: 2355–2362.
109. Lim K. Y., Matyasek R., Kovarik A., Leitch A. R. 2004. Genome evolution in allotetraploid *Nicotiana*. *Biol J Lin Soc*, 82:599–606.
110. 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. *NtTPNI*: a *RPP8*-like *R* gene required for *Potato virus Y*-induced veinal necrosis in tobacco. *The Plant Journal*, 95: 700-714.
111. Michel V., Julio E., Candresse T., Cotucheau J., Decorps C., Volpatti R., Moury B., Glais L., Jacquot E., Dorlhac de Borne F., Decroocq V., Gallois J.L., German -Ratana S. 2019. A complex eIF4E locus impacts the durability of *va* resistance to *Potato virus Y* in tobacco. *Molecular Plant Pathology*, 20(8): 1051-1066.
112. Mandal B, Pappu H. R., Culbreath A. K., Holbrook C. C., Todd J. W. 2002. Differential response of selected peanut (*Arachis hypogaea*) genotypes to mechanical inoculation by *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Dis* 86: 939–944.
113. 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.

114. Merxmüller H., Butler K. P. 1975. *Nicotiana* in der Afrikanischen Namib—ein Pflanzengeographisches und Phylogenetisches Ratsel. *Mitteilungen aus der Botanischen Staatssammlung München* 12: 91–104.
115. Moon H, Nicholson J. S. 2007. AFLP and SCAR markers linked to *Tomato Spotted Wilt Virus* resistance in tobacco. *Crop Sci* 47:1887–1894.
116. Mumford R. A., Barker I., Wood K. R. 1996. The biology of the tospoviruses. *Ann. Appl. Biol.* 128: 159–183.
117. Naim F., Nakasugi K., Crowhurst R. N., Hilario E., Zwart A. B., Hellens R. P., Taylor J. M., Waterhouse P. M., Wood C. C. 2012. Advanced engineering of lipid metabolism in *Nicotiana benthamiana* using a draft genome and the V2 viral silencing-suppressor protein. *PLoS ONE*, 7:e52717.
118. Navarro-Quezada A., Gase K., Singh R. K., Pandey S. P., Baldwin I. T. 2020. *Nicotiana attenuate* Genome Reveals Genes in the Molecular Machinery Behind Remarkable Adaptive Phenotypic Plasticity. *The Tobacco Plant Genome*, 13: 211-229.
119. Noguchi S., Tajima T., Yamamota 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.
120. Nolla J. S. B., Roque A. 1933. A variety of tobacco resistant to ordinary tobacco mosaic. *Journal of Puerto Rico Department of Agriculture*, 17: 301-301.
121. Opoka B. 1974. Obserwacje nad podatnością ważniejszych krajowych odmian tytoniu na *Lycopersicum virus 3* Smith w prowokacyjnych warunkach polowych. *Pamiętnik Puławski – Prace IUNG*, 60: 147-153.
122. Opoka B. 1969. Odporność dzikich gatunków *Nicotiana* na *Lycopersicon virus 3* (Brittlebank) Smith. *Hodowla roślin, aklimatyzacja i nasiennictwo*, 13 ( 1): 83-88.
123. Palakarcheva M., Yancheva A. 1989. Genetic sources of resistance to tomato bronziness pathogen on tobacco in wild species of the genus *Nicotiana*. *Genet Breed* 22, 473–479.
124. Parella G., Gognalons P., Gebre-Sellassie K., Vovlas C., Marchoux G. 2003. An update of the host range of *Tomato spotted wilt virus*. *J. Plant Pathol.* 85: 227–264.
125. Pombo M. A., Rosli H. G., Fernandez-Pozo N., Bombarely A. 2020. *Nicotiana benthamiana*, A Popular Model for Genome Evolution and Plant-Pathogen Interactions. *The Tobacco Plant Genome*, 14: 231-247.
126. Przybyś M. 2012. Tytoń – zielony bioreaktor. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 31(5): 133-154.

127. Przybyś M., Doroszevska 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.
128. Robaglia C., Caranta C., 2006. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science*, 11(1): 40-45.
129. Robaglia C., Durand-Tardif M., Tronchet M., Boudazin G., Astier-Manifacier S., Casse-Delbart F., 1989. Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA. *Journal of General Virology*, 70: 35-947.
130. Sievert R.C. 1972. Sources of resistance to potato virus Y in the genus *Nicotiana*. *Tobacco Science*, 106: 92-94.
131. Scholthof K.-B. G., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G. D. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 2011, 12(9): 938-954.
132. Shinozaki K., Ohme M., Tanaka M., Wakasugi T., Hayashida N., Matsubayashi T., Zaita N., Chunwongse J., Obokata J., Yamaguchi-Shinozaki K. 1986. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J*, 5: 2043.
133. Shoji T., Kajikawa M., Hashimoto T. 2010. Clustered transcription factor genes regulate nicotine biosynthesis in tobacco. *Plant Cell*, 22(10): 3390-3409.
134. 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*, 8;5: 3833.
135. Sierro N., Battey J.N.D., Bovet L., Liedschulte V., Ouadi S., Thomas J., Broye H., Laparra H., Vuarnoz A., Lang G., Goepfert S., Peitsch M.C., Ivanov N.V. 2018. The impact of genome evolution on the allotetraploid *Nicotiana rustica*—an intriguing story of enhanced alkaloid production. *BMC Genom*, 19: 855.
136. Sierro N., Battey J.N.D., Ouadi S., Bovet L., Goepfert S., Bakaher N., Peitsch M.C., Ivanov N.V. 2013. Reference genomes and transcriptomes of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis*. *Genome Biol*, 14 (6): R60.
137. Sisson V. A., Severson R. F. 1990. Alkaloid Composition of the *Nicotiana* Species. *Beitrag zur Tabakforschung International*, 14(6): 327-339.
138. Stange C., Matus J. T., Elorza A., Arce-Johnson P. 2004. Identifikation and characterization of novel tobacco mosaic virus resistance N-gene homologue in *Nicotiana tabacum* plants. *Functional Plant Biology*, 31: 149-158.

139. Stehmann J. R., Semir J., Ippolito A. 2002. *Nicotiana mutabilis* (Solanaceae), a new species from souther Brazil. *Kew Bulletin*, 57: 639-646.
140. Symon D. E., Keneally K. F. 1994. A new species of *Nicotiana* (Solanaceae) from near Broom. *Western Australia Nyutsia*, 9: 421-425.
141. Symon D. E., Lepschi B. J. 2007. A new status in *Nicotiana* (Solanaceae): *N. monoschizocarpa* (P. Horton) Symon & Lepschi. *Journal of the Adelaide Botanical Garden*, 21: 92.
142. Symon D. E. 1998. A new *Nicotiana* (Solanaceae) from near Coober Pedy, South Australia. *J Adelaide Bot Gard*, 18: 1–4.
143. Tezuka T., Kuboyama T., Matsuda T., Marubashi W. 2010. Seven of eight species in *Nicotiana* section *Suaveolentes* have common factors leading to hybrid lethality in crosses with *Nicotiana tabacum*. *Annals of Botany*, 106: 267-276.
144. Thole V., Dalmay T., Burgyán J., Balázs E. 1993. Cloning and sequencing of potato virus Y (Hungarian isolate) genomic RNA. *Gene*, 123: 149-156,
145. 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.
146. TRI, 2016, Tobacco Research Institute of the Chinese. Academy of Agricultural Sciences. Bulletin.
147. Trojak-Goluch A., Kawka-Lipińska M. 2022. Główne alkaloidy tytoniu – charakterystyka, przemiany w roślinie oraz wyzwania dla hodowli roślin. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 68(22): 129-149.
148. Trojak-Goluch A., Laskowska D., Agacka M., Czarnecka D., Kawka M., Czubačka A. 2011. Effectiveness of combining resistance to *Thielaviopsis basicola* and *Tomato spotted wilt virus* in haploid tobacco genotypes. *Breeding Science*, 61(4): 389-393.
149. Tsakiridis J.P., Gooding G.V. 1972. Tomato spotted wilt virus in Greece. *Phytopathol. Mediterr.* 11, 42–47.
150. Verrier J. L., Doroszeńska 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>.
151. Verrier J. L., Doroszeńska T. 2002. The PVY collaborative experiment 1996–2002: a global synthesis of results, Report of the Agronomy and Phytopathology Group of CORESTA (Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco ), available on website: <http://www.imperialtobaccoscience.com>

152. Valleau W. D. 1952. Breeding tobacco for disease resistance. *Economic Botany* 6: 69-102.
153. Van Dijk P., Cuperus C. 1989. Reactions on *Nicotiana* species to potato viruses A, X and Y and tobacco mosaic virus in relation to their taxonomy and geographical origin. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 95: 343–356.
154. Wernsman E. A. 1991.: Varied roles for the haploid sporophyte in plant improvement. In: *Plant breeding in the 1990s*, H. T. Stalker and J. P. Murphy (eds). Proc. Symp. Plant Breeding in the 1990s, Raleigh, NC. March 1991. CABI Publ., Wallingford, UK, 1992, pp. 461-484.
155. Wen C., Wu Y., Li H., Wang H., Liu Q. 1999. Influences on photosynthesis and respiration of tobacco infected by Potato Virus Y – vein necrosis strain. *Bull. Inf. CORESTA*, Suzhou, China, 10-11.
156. White R. F. and Sugars J. M. 1996. The systemic infection by tobacco mosaic virus of tobacco plants containing the *N* gene at temperatures below 28°C. *Journal of Phytopathology* 144: 139–142.
157. Wijkamp I., Van Lent J., Kormelink R., Goldbach R., Peters D. 1993. Multiplication of Tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *J. Gen. Virol.* 74, 341–349.
158. 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.
159. Wylie S., Li H. 2022. Historical and Scientific Evidence for the Origin and Cultural Importance to Australia’s First-Nations People of the Laboratory Accession of *Nicotiana benthamiana*, a Model for Plant Virology. *Viruses*, 14, 771.
160. Xu S., Brockmoller T., Navarro-Quezada A., Kuhl H., Gase K., Ling Z., Zhou W., Kreitzer C., Stanke M., Tang H., Lyons E., Pandey P., Pandey S.P., Timmermann B., Gaquerel E., Baldwin I.T. Wild tobacco genomes reveal the evolution of nicotine biosynthesis. *Proc Natl AcadSci USA*, 2017, 114: 6133–6138.
161. Yancheva A. 1990. A possibility for transferring combined resistance to tomato spotted wilt virus and *Thielaviopsis basicola* to intercultural tobacco hybrids (in Bulgarian). *Genet Breed* 23(3):194–199.

162. Yuan X., Yan Ch., Wu Z., Ren F., Zhang H., Baker B., Chen J. and Kuang H. 2015. Frequent gain and loss of resistance against *Tobacco mosaic virus* in *Nicotiana* species. *Molecular Plant* 8: 1813–1815.
163. Yukawa M., Tsudzuki T., Sugiura M. 2006. The chloroplast genome of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis*: complete sequencing confirms that the *Nicotiana sylvestris* progenitor is the maternal genome donor of *Nicotiana tabacum*. *Mol Genet Genomics*, 275: 367–373.
164. Zhang G. Y., Chen M., Guo J. N., Xu T. W., Li L. C., Xu Z. S., Ma Y. Z., Chen X. P. 2009. Isolation and characteristics of the *CN* gene, a Tobacco mosaic virus resistance *N* gene homolog, from tobacco. *Biochemical Genetics*, 47: 301-314.

## 10. Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim

### Ocena zasobów genowych rodzaju *Nicotiana* pod względem odporności na najważniejsze choroby wirusowe tytoniu

**Słowa kluczowe:** *Nicotiana*, tytoń, wirus mozaiki tytoniu, wirus brązowej plamistości pomidora, wirus Y ziemniaka, odporność na choroby wirusowe

Rodzaj *Nicotiana* jest jednym z liczniejszych w rodzinie *Solanaceae*. Zawiera ponad 80 gatunków bardzo zróżnicowanych pod względem cech morfologicznych, liczby chromosomów i rozmieszczenia geograficznego, a także różniących się składem alkaloidowym i odpornością na choroby i szkodniki. Naturalnym miejscem pochodzenia dzikich gatunków tytoniu jest Ameryka Północna i Południowa, Australia i wyspy na Pacyfiku oraz Afryka. Najbardziej znanym i rozpowszechnionym gatunkiem rodzaju *Nicotiana* jest tytoń szlachetny (*Nicotiana tabacum*). Powstał on w wyniku spontanicznego krzyżowania *Nicotiana sylvestris* i *Nicotiana tomentosiformis*. Liczący obecnie wiele odmian jest jedną z ważniejszych roślin przemysłowych w Polsce i na świecie.

Kolekcja rodzaju *Nicotiana* zgromadzona obecnie w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowym Instytucie Badawczym obejmuje 1008 obiektów, w obrębie których występują zarówno dzikie gatunki *Nicotiana*, jak również odmiany *Nicotiana tabacum* i *Nicotiana rustica*. Ogromna różnorodność w obrębie rodzaju *Nicotiana* sprawia, że jest on doskonałym źródłem zmienności w zawężającej się puli genowej i może być wykorzystywany w programach hodowlanych, szczególnie w hodowli odpornościowej. Dlatego też tak ważna jest szczegółowa wiedza w zakresie odporności materiałów kolekcyjnych na najważniejsze pod względem gospodarczym patogeny.

Spośród chorób powodujących straty w uprawie tytoniu choroby wirusowe mają szczególne znaczenie ze względu na bardzo małą skuteczność ochrony chemicznej pozwalającej jedynie na ograniczanie występowania wektora. Największe zagrożenie dla uprawy tytoniu w Polsce i w wielu krajach świata stanowi wirus Y ziemniaka (*Potato virus Y*, PVY), wirus brązowej plamistości pomidora na tytoniu (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) oraz w ostatnich latach pojawiający się coraz częściej wirus mozaiki tytoniu (*Tobacco mosaic virus*, TMV).



Celem rozprawy doktorskiej była ocena zasobów genowych rodzaju *Nicotiana* pod względem odporności na najważniejsze choroby wirusowe. Badania odpornościowe uwzględniały objawy chorobowe, będące efektem inokulacji, określenie obecności wirusa w zakażonych roślinach na podstawie badań serologicznych oraz ocena odporności genotypów na poszczególne patogeny z wykorzystaniem specyficznych markerów molekularnych.

Przeprowadzone badania zasobów genowych rodzaju *Nicotiana* pod względem odporności na najważniejsze patogeny wirusowe tytoniu wykazały jej duże zróżnicowanie w ocenie biologicznej, serologicznej, jak i molekularnej.

Badania w kierunku odporności na wirusa Y ziemniaka wykazały, że w obrębie rodzaju *Nicotiana* cztery gatunki: *N. africana*, *N. raimondii*, *N. knightiana* i *N. glauca*, mają całkowitą odporność, a 26 gatunków wykazywało objawy tolerancji na wszystkie badane izolaty PVY. Pozostałe charakteryzowały się zróżnicowaną odpornością w zależności od użytego izolatu. Badania molekularne wykazały, że w obrębie 25 odmian tytoniu w 9 stwierdzono obecność genu podatności *Va*, zaś pozostałe 16 nie amplifikowały tych markerów. Brak produktów amplifikacji wskazuje, że odmiany te posiadają delecję w obrębie genu podatności (odporność typu *va*). Odmiany z odpornością typu *va* wykazywały zróżnicowaną poziom reakcji na infekcję PVY, co może świadczyć o różnej długości delecji w genie podatności. Najwyższą odpornością cechowała się odmiana VAM. Pięć odmian wykazało tolerancję wobec wszystkich izolatów PVY. Nie wystąpiły u nich nekrozy, jedynie przejaśnienia nerwów i plamy chlorotyczne. W badaniach molekularnych wykazano, że posiadały one gen podatności *Va*, co może świadczyć o innym podłożu genetycznym stwierdzonej tolerancji. Odmiana Węgierski Ogrodowy, mimo obecności genu *Va*, nie uległa porażeniu izolatem określanym jako słaby, a na izolat średni zareagowała jedynie objawami tolerancji. Izolaty silne spowodowały u niej nekrozę nerwów, co pozwala wnosić, że odmiana ta posiada inny rodzaj odporności niż pozostałe badane odmiany.

Badania obiektów w kierunku odporności na wirusa brązowej plamistości pomidora na tytoniu wskazują, że odporność typu nadwrażliwości obecna jest w gatunkach *N. alata* i *N. forgetiana*, mieszańcu *Nicotiana x sanderae* i dwóch odmianach tytoniu uprawnego (Polalta i Wiktoria). Odporność poszczególnych obiektów gatunku *N. alata* była zróżnicowana, bowiem w obrębie kilku badanych populacji część roślin uległo porażeniu systemicznemu. Reakcja odpornościowa na TSWV pozostałych obiektów kolekcyjnych była również zróżnicowana. Objawy tolerancyjne zaobserwowano u 9 dzikich gatunków, natomiast 71 gatunków wykazało znacznie silniejsze objawy infekcji. Prezentowane po raz

pierwszy wyniki odporności stosunkowo niedawno odkrytego gatunku *Nicotiana mutabilis*, wskazują, że jest on tolerancyjny na PVY oraz wykazuje reakcję nadwrażliwości w stosunku do TSWV.

W badaniach odpornościowych na wirusa mozaiki tytoniu, prowadzonych w zróżnicowanych warunkach temperaturowych, wykazano cztery typy reakcji. Najczęściej występującą reakcją była podatność, która polegała głównie na wystąpieniu mozaikowych przebarwień na liściach. Drugi rodzaj reakcji to tolerancja, która charakteryzowała się brakiem widocznych objawów w temperaturze 22/20°C (dzień/noc), ale wirus był obecny w roślinie. Objawy mozaikowe w przypadku tolerancji były widoczne w temperaturze 30/28°C. Trzecia grupa badanych odmian *Nicotiana tabacum* posiadała odporność warunkowaną przez gen *N* pochodzący z gatunku *N. glutinosa*. Przyjmuje ona postać nadwrażliwości i jest zależna od temperatury. Wykazano, że w rodzaju *Nicotiana* alternatywnym źródłem odporności na TMV jest gatunek *N. gossei*, który wykazuje reakcję nadwrażliwości i nie amplifikuje genu *N*. Odporność tego gatunku jest niezależna od temperatury.

Przeprowadzone badania wykazały duże zróżnicowanie w obrębie rodzaju *Nicotiana* pod względem odporności na patogeny wirusowe. Obiekty kolekcyjne odporne na poszczególne wirusy są cennym źródłem genów w hodowli odpornościowej i przedmiotem dalszych badań.

## 11. Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku angielskim

### Summary

#### **Evaluation of genetic resources of the genus *Nicotiana* for the resistance to major viral diseases of tobacco**

**Key words:** *Nicotiana*, tobacco, *Tobacco mosaic virus*, *Tomato spotted wild virus*, *Potato virus Y*, resistance to viral diseases

The genus *Nicotiana* is one of the more numerous in the Solanaceae family. It contains more than 80 species highly diverse in morphological characteristics, chromosome number and geographic distribution, as well as differing in alkaloid composition and disease and pest resistance. The natural place of origin of wild tobacco species is North and South America, Australia and Pacific Islands, and Africa. The most well-known and widespread species of the genus *Nicotiana* is tobacco (*Nicotiana tabacum*). It was created by spontaneous crossbreeding between *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis*. It includes many cultivars today and is one of important industrial plants in Poland and worldwide.

The collection of the genus *Nicotiana* gathered at the Institute of Soil Science and Plant Cultivation - State Research Institute currently includes 1008 objects, within which there are both wild *Nicotiana* species, as well as *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana rustica* cultivars. The enormous diversity within the *Nicotiana* genus makes it an excellent source of variation in a narrowing gene pool and can be used in breeding programs, especially for resistance breeding. This is why detailed knowledge of the resistance of collection materials to the most economically important pathogens is so essential.

Among the diseases causing losses in tobacco cultivation, viral ones are of particular importance due to the very low effectiveness of chemical protection which only reduces the incidence of the vector. The greatest threat to tobacco cultivation in Poland and in many countries of the world are *Potato virus Y* (PVY), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) and *Tobacco mosaic virus* (TMV) which appears more and more frequently in recent years.

The aim of the dissertation was to evaluate the gene pool of the genus *Nicotiana* for resistance to major viral diseases. Resistance studies included observation of disease symptoms resulting from inoculation, determination of the presence of the virus in infected plants based on serology and the evaluation of genotypes in terms of resistance to specific pathogens using specific molecular markers.

A study of the genetic resources of the genus *Nicotiana* in terms of resistance to the most important viral pathogens of tobacco showed its great diversity in biological, serological as well as molecular evaluation.

Tests for resistance to *Potato virus Y* showed that within the genus *Nicotiana*, four species: *N. africana*, *N. raimondii*, *N. knightiana* and *N. glauca*, were characterized by complete resistance, and 26 species showed symptoms of tolerance to all PVY isolates tested. The others were characterized by varying resistance depending on the isolate used. Molecular studies showed that within 25 tobacco cultivars, the *Va* susceptibility gene was found in 9, while the remaining 16 did not amplify these markers. The lack of amplification products indicated that these cultivars had a deletion within the susceptibility gene (*va*-type resistance). Cultivars with *va*-type resistance showed varying level of response to PVY infection, which may indicate different length of deletion in the susceptibility gene. The highest resistance was in cv. VAM. Five cultivars showed tolerance to all tested PVY isolates. They did not develop necrosis, only vein clearing and chlorotic spots. Molecular studies showed that they had the *Va* susceptibility gene which may indicate a different genetic basis for their tolerance. Cultivar Węgierski Ogrodowy, despite the presence of the *Va* gene, was not affected by the isolate considered as weak. Moreover, this cultivar reacted only with tolerance symptoms after inoculation with the medium isolate while strong ones caused vein necrosis. This allows us to conclude that cv. Węgierski Ogrodowy has a different type of resistance than the other tested cultivars.

Tests for resistance to *Tomato spotted wilt virus* indicated that in the species *N. alata* and *N. forgetiana*, the hybrid *Nicotiana* x *sanderae* and two tobacco cultivars (Polalta and Wictoria) the resistance of the hypersensitive type is present. The resistance of *N. alata* accessions was varied, as within the several tested populations, some plants became systemically infected. The response to TSWV inoculation of the remaining collection accessions was also varied. Tolerant symptoms were observed in case of 9 wild species while 71 species showed much stronger disease symptoms. The resistance tests of a relatively recently discovered species *Nicotiana mutabilis* indicated that it was tolerant to PVY and showed a hypersensitive response to TSWV. It is worth noting that the results concerning the resistance of this species has been presented for the first time.

The resistance tests against *Tobacco mosaic virus* were conducted under varying temperature conditions and as a result four types of plant reactions were reported. The most common reaction was susceptibility which consisted mainly of the appearance of mosaic discoloration on the leaves. The second type of reaction was tolerance characterized by the

absence of visible symptoms at 22/20°C (day/night) while the virus was present in a plant whereas mosaic symptoms were visible at 30/28°C. The third group of tested *Nicotiana tabacum* cultivars had resistance conditioned by the *N* gene originated from *N. glutinosa*. They developed hypersensitivity symptoms regardless of what the temperature was. It has been shown that in the genus *Nicotiana*, an alternative source of TMV resistance is the species *N. gossei* which exhibits a hypersensitive response and does not amplify the *N* gene. The resistance of this species is independent of temperature.

The presented studies have shown great variation within the genus *Nicotiana* for resistance to viral pathogens. Collection accessions resistant to individual viruses are a valuable sources of genes for resistance breeding and may be the objects of further research.

## **12. Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej**

## RESISTANCE OF WILD *NICOTIANA* SPECIES TO DIFFERENT PVY ISOLATES<sup>1</sup>

T. Doroszevska and A. Depta

### Abstract

Veinal necrosis of tobacco leaves caused by *Potato virus Y* (PVY) is a disease of major economic importance. The appearance of new virus isolates, capable of breaking the resistance of tobacco, prompts the investigators to search for sources of resistance among wild species of the genus *Nicotiana*.

A total of 96 entries, including 68 species, autotetraploid forms and botanical varieties were screened for resistance. The tests comprised six isolates which belonged to three groups, PVY<sup>NW</sup>, PVY<sup>NZ</sup> and PVY<sup>NTN</sup>, that differed for their serological characteristics and for their ability to break resistance from different sources. The plants were mechanically inoculated in the greenhouse. Records were taken of developing disease symptoms and DAS-ELISA tests were performed using two kinds of antibodies manufactured by Bioreba.

The *Nicotiana* species varied extensively for their resistance to the isolates used. The highest number of resistant species was found within the section *Paniculatae*. *Nicotiana raimondii*, diploid and tetraploid forms of *N. knightiana*, as well as tetraploid *N. glauca* were found completely resistant. *Nicotiana benavidesii*, *N. wigandioides* and *N. noctiflora* were also highly resistant. Among the species of the subgenus *Petunioides* only *N. africana* showed resistance to all isolates. The other species became infested to various degree depending on the isolate used and they developed symptoms that varied in appearance and intensity.

**Key words:** *Nicotiana* species, *Potato virus Y*, isolates, resistance, DAS-ELISA

---

<sup>1</sup>This study was financially supported by the Polish Ministry of Agriculture and Rural Development under the project HORzg: "Collection, conservation, evaluation, *in vivo* maintenance of genetic resources of plants and their pathogens and benefit-sharing to meet the needs of the national economy".

## Introduction

The genus *Nicotiana* ranks sixth largest in number of the *Solanaceae* family with 70 naturally occurring species. Based on the systematics developed by Goodspeed (1954) which took account of the differences in general morphology, trichome anatomy, karyotype analysis and chromosome behaviour of interspecific hybrids, as well as in geographical distribution, the genus was divided into three subgenera and 14 sections. Newly discovered species were subsequently added to the classification (Burbidge 1960, Chase et al. 2003). In the recent years, molecular methods both confirmed the correctness of the manner in which Goodspeed placed the species in individual sections and also allowed the verification of some erroneous placements. Based on those new findings, a new systematics was developed in which division into subgenera was discarded, and only sections were retained (Knapp et al. 2004). The majority of the species of *Nicotiana* are native to North and South America and some are indigenous to Australia and Pacific islands. There is only one African species of *Nicotiana* which originates from isolated mountainous areas in Namibia (Merxmüller and Buttler 1975). Their extensive area of origin as well as different evolutionary pathways make the *Nicotiana* species an extremely diversified assemblage of plants. As such, they provide an excellent source of variation for the gene pool in *Nicotiana* which, due to the long-standing breeding process, is becoming increasingly narrow.

*Nicotiana* species are extensively exploited in genetic and botanical research and they provide a vast reservoir of genes that confer resistance to fungal, bacterial and viral diseases. One of the major virus diseases in tobacco is brown veinal necrosis caused by necrotic strains of *Potato virus Y* (PVY). The necrosis of veins interferes with the transport of water and mineral salts to leaf tissues while the necrosis of the leaf blade reduces the assimilation area and photosynthetic capability and also restricts gaseous exchange thereby affecting the growth of plants (Wen et al. 1999). As a result, quality of commercial leaf is reduced and metabolic pathways are negatively affected leading to increased nitrate content in the leaves (Verrier et al. 2001). Breeding for resistance that utilizes available sources of resistance is the most efficient method to control the disease. The most widely used is resistance controlled by a single recessive gene, referred to as *va*, an X-irradiation-induced mutation produced by Koelle (1961) as well as by its allelic forms (Wernsman 1992, Ano et al. 1995). A similar mechanism of resistance obtained as a result of mass selection is present in many cultivars grown in different countries (Carsten and Seehofer 1960, Doroszevska 2008). Unfortunately, that resistance is not effective against new isolates which belong both to PVY<sup>NTN</sup> and to PVY<sup>NW</sup> groups and which have been arising with increasing frequency across the world (Doroszevska and Verrier 2004, Doroszevska 2008).

Consequently, the most important task is to search for new sources of resistance which would be effective against all isolates. The objective of this study was to evaluate the resistance of *Nicotiana* species to different PVY isolates to benefit



the needs of tobacco breeding and to contribute to the description of the biodiversity of those species.

## Material and methods

The study comprised 96 entries including 68 species of *Nicotiana* and their seven autotetraploid variants, 12 botanical varieties of *N. rustica* and nine botanical varieties of *N. tabacum*. All tested accessions came from the collection maintained at the Institute of Soil Science and Plant Cultivation in Puławy. Testing for resistance was done in the greenhouse under natural sunlight condition during the seasons 2007-2009, starting from March each year. The seeds were sown each entry into a single pot, the plants were grown until a 3<sup>rd</sup>-4<sup>th</sup> leaf stage, and repotted singly into pots filled with peat growth medium. The inoculation was done at a 5<sup>th</sup>-6<sup>th</sup> leaf stage. In order to prevent possible infection with *Tobacco mosaic virus* (TMV), the cv. 'Samsun H' showing hypersensitive response to TMV and, at the same time, highly susceptible to all PVY strains was used for PVY multiplication and isolate preparation. Juice from 'Samsun H' plants infected with serologically-identified PVY isolates was rubbed into carborundum-dusted leaves of the tested entries. The inoculated plants were kept from direct sunlight for 48 h following inoculation. Observations were made two times and records were taken of developing disease symptoms. Following four weeks after inoculation leaf samples were taken to measure the virus concentration. DAS-ELISA tests were performed using monoclonal antibodies against necrotic PVY strains (MoAbs antiY<sup>N</sup>) – IgG1 12712, referred to as ELISA 2 and manufactured by the company Bioreba (Gugerli and Fries 1983). Plants of 'Samsun H' were used as positive control and plants of the respective entry not exposed to the virus as negative control.

The tests were conducted on 30 plants of each entry with five plants being inoculated with a single isolate. A total of six isolates from the one's own collection belonging to different PVY groups were used:

- PVY<sup>NW</sup>(-) – isolated from a susceptible cultivar (Doroszewska 2008), does not overcome major resistance sources of *va* type in tobacco and is not detectable by monoclonal antibodies (MoAbs antiY<sup>N</sup>),
- PVY<sup>NW</sup>(+) – isolated from a resistant cultivar, overcomes *va* resistance in tobacco (Doroszewska 2008); it is not detectable by monoclonal antibodies (MoAbs antiY<sup>N</sup>),
- PVY<sup>NZ</sup> – virulent necrotic (Gajos 1971), overcomes resistance of most tobacco cultivars, does not infect potatoes (Chrzanowska and Doroszewska 1997) which accounts for its low incidence in tobacco fields; it is detectable by two kinds of Bioreba-manufactured antibodies,
- PVY<sup>NTN</sup>Pol(-) – isolated in Poland from a susceptible cultivar (Doroszewska 2008), does not overcome *va* resistance, detectable by two kinds of Bioreba-manufactured antibodies,

– PVY<sup>NTN</sup>Pol(+) – isolated in Poland from a resistant cultivar (Doroszevska 2008), overcomes *va* resistance, detectable by two kinds of Bioreba-manufactured antibodies,

– PVY<sup>NTN</sup>Ge(+) – isolated from a resistant cultivar in Germany within CO-RESTA Sub-Group Collaborative Study on *Potato Virus Y* (Doroszevska 2007), overcomes *va* resistance, detectable by two kinds of Bioreba-manufactured antibodies.

## Results

Results of testing for resistance of all 96 entries are presented in Table 1 arranged in accordance with systematic position of species (Goodspeed 1954, Burbidge 1960, Merxmüller and Buttler 1975, Chase et al. 2003).

Depending on the species involved and the challenging PVY strain the tested species varied for the degree of their resistance to PVY and for the symptoms developed.

Listed as the first by Goodspeed (1954), the subgenus *Rustica* comprises three sections: *Paniculatae*, *Thyrsiflorae* and *Rusticae*.

Currently, in the section *Paniculatae* are classified eight 24-chromosome species (Chase et al. 2003) indigenous to South America (Bolivia, Argentina, Chile and Peru). Seven of them were tested for PVY resistance. The majority of the species showed resistance to the isolates used in the tests (Table 1). *Nicotiana raimondii*, *N. knightiana* and its tetraploid variant as well as the tetraploid form of *N. glauca* did not develop any disease symptoms nor was the virus detectable using the serological method. Diploid *N. glauca* did not develop disease symptoms, but the presence of the virus was confirmed by ELISA in the plants challenged with PVY<sup>NZ</sup>. High resistance was also shown by *N. benavidesii* – infected solely by PVY<sup>NZ</sup> – and somewhat lower by *N. cordifolia* and *N. solanifolia* as the latter two resisted only three isolates. The tested species did not develop vein necrosis. If produced by a challenging isolate, the symptoms were confined mainly to chlorotic spots and rings or vein clearing in the plants of *N. paniculata*, *N. solanifolia*, *N. benavidesii* and *N. cordifolia*.

*Nicotiana thyrsiflora*, a 24-chromosome species, was discovered in the northern part of Peru and is the only representative of the section *Thyrsiflorae*. It responded with vein clearing and with chlorotic spots to the majority of the isolates, with only PVY<sup>NZ</sup> producing necrotic spots (Table 1).

*Nicotiana rustica*, the sole species in the section *Rusticae*, is widespread in the world due to its previous cultivation, although its origin reaches back to South America. It is a 48-chromosome form. Out of 12 botanical varieties of *N. rustica* tested in the study, three were challenged with six isolates and the remaining nine with only three isolates (Table 1). None of the varieties showed complete resistance although *N. rustica* var. *brasiliana* and *N. rustica* var. *pumila* were found the least susceptible. The responses varied with the isolate used. The most frequent symp-

Table 1

Evaluation of *Nicotiana* species resistance to different PVY isolates

Species	PVY <sup>NTN</sup> W(-)		PVY <sup>NTN</sup> W(+)		PVY <sup>NTN</sup> Pol(-)		PVY <sup>NTN</sup> Pol(+)		PVY <sup>NTN</sup> Ge(+)		PVY <sup>NTN</sup>	
	symptoms	ELISA	symptoms	ELISA	symptoms	ELISA	symptoms	ELISA	symptoms	ELISA	symptoms	ELISA
		1		2		1		2		1		2
<b>Subgenus: <i>Rustica</i></b>												
<b>Section: <i>Paniculatae</i></b>												
<i>N. glauca</i>	ns	-	ns	-	ns	-	ns	-	ns	-	ns	+
<i>N. glauca</i> (tetra)	ns	-	ns	-	ns	-	ns	-	ns	-	ns	-
<i>N. paniculata</i>	ns	+	CS, mVC	+	ns	+	CS, mVC	+	CS, mVC	+	VC	+
<i>N. knightiana</i>	ns	-	ns	-	ns	-	ns	-	ns	-	ns	-
<i>N. knightiana</i> (tetra)	ns	-	ns	-	ns	-	ns	-	ns	-	ns	-
<i>N. solanifolia</i>	ns	-	ns	-	CS, CR	+	mCS	+	ns	-	CS, CR	+
<i>N. benavidesii</i>	ns	-	ns	-	ns	-	ns	-	ns	-	CR	+
<i>N. cordifolia</i>	ns	-	VC, CS	+	ns	-	VC, CS	+	VC, CS	+	ns	-
<i>N. rainmondii</i>	ns	-	ns	-	ns	-	ns	-	ns	-	ns	-
<b>Section: <i>Thyrsiflorae</i></b>												
<i>N. thyrsiflora</i>	VC, CS	+	VC, mDf	+	CS, CR	+	VC, mDf	+	VC, mDf	+	NS, NR	+
<b>Section: <i>Rusticae</i></b>												
<i>N. rustica</i> var. <i>argentea</i>	VC	+	Df, ns, CS	+	CS, CR	+	VC, CS	+	mCS	+	VC	+
<i>N. rustica</i> var. <i>pumila</i>	ns	-	CS, VC	+	ns	-	CS, VC	+	CS, VC	+	NR	+
<i>N. rustica</i> var. <i>brasilia</i>	ns	-	CS	+	ns	-	mCS	+	CS, mVC	+	ns	-
<i>N. rustica</i> var. <i>cerinthoides</i>	nt	-	CS, mVC	+	nt	-	sevCS	+	ns/mCS	+	nt	-
<i>N. rustica</i> var. <i>chlorotica</i>	nt	-	CS	+	nt	-	CS	+	CS	+	nt	-
<i>N. rustica</i> var. <i>eischfeldii</i>	nt	-	CS, VC, NS	+	nt	-	CS, VC	+	CS, mVC	+	nt	-
<i>N. rustica</i> var. <i>humilis</i>	nt	-	sevCS, VC	+	nt	-	CS, VC	+	mCS, mVC	+	nt	-
<i>N. rustica</i> var. <i>neuchestii</i>	nt	-	CS	+	nt	-	sevCS	+	ns	-	nt	-
<i>N. rustica</i> var. <i>ovata</i>	nt	-	mMs	+	nt	-	CS	+	CS, VC, Ms	+	nt	-
<i>N. rustica</i> var. <i>oviformis</i>	nt	-	CS, mVC	+	nt	-	CS, mVC	+	CS, mVC	+	nt	-

Table 1 – cont.

Species	PVY <sup>W</sup> (-)		PVY <sup>W</sup> (+)		PVY <sup>NTN</sup> Pol(-)		PVY <sup>NTN</sup> Pol(+)		PVY <sup>NTN</sup> Ge(+)		PVY <sup>NZ</sup>	
	symptoms	ELISA 1 2	symptoms	ELISA 1 2	symptoms	ELISA 1 2	symptoms	ELISA 1 2	symptoms	ELISA 1 2	symptoms	ELISA 1 2
<i>N. rustica</i> var. <i>pavonii</i>	nt		CS, mVC	+	nt		CS, VC, NS	+	CS, mVC	+	nt	
<i>N. rustica</i> var. <i>texana</i>	nt		Ms	+	nt		CS	+	sevDf, NS, Ms	+	nt	
<b>Subgenus: <i>Tabacum</i></b>												
<b>Section: <i>Tomentosae</i></b>												
<i>N. tomentosa</i>	ns	-	nt		ns	-	nt		nt		VC	+
<i>N. tomentosiformis</i>	ns	-	VC	+	VC	+	VN	+	VN		CS, VC	+
<i>N. otophora</i>	ns	-	VC	+	ns	-	VC	+	VC, CS, mDf	+	ns	-
<i>N. kawakamii</i>	ns	-	VC	+	CR	+	VC, CS	+	VC, Df, sevMs	+	VC	+
<i>N. setchelli</i>	ns	-	mVC	+	ns	-	VC	+	VC	+	ns	-
<i>N. glutinosa</i>	VC	+	VC, CS, Df, Ms	+	VC, CR	+	VC, CS, mDf, mM <sub>s</sub>	+	CS, VC, NS, VN, Df, Ms	+	VC	+
<b>Section: <i>Genuinae</i></b>												
<i>N. tabacum</i> var. <i>xantii</i>	VC, VN	+	CS, VC, VN	+	VC, VN	+	CS, VC, NS, VN	+	VC, CS, NS, VN	+	VN	+
<i>N. tabacum</i> var. <i>artropurpurea grandiflora</i>	nt		CS, VC, VN		nt		CS, VC, VN		CS, VC, VN		nt	
<i>N. tabacum</i> var. <i>auriculata</i>	nt		VC, CS, VN		nt		VC, VN		VC, VN		nt	
<i>N. tabacum</i> var. <i>fruticosa</i>	nt		VC, VN		nt		VC, CS, VN		VC, VN		nt	
<i>N. tabacum</i> var. <i>gigantea</i>	nt		VC, VN		nt		CS, VC, NS, VN		CS, VC, NS, VN		nt	
<i>N. tabacum</i> var. <i>havenensis</i>	nt		VC, VN		nt		CS, VC, VN		VC, VN		nt	
<i>N. tabacum</i> var. <i>petiolaris</i>	nt		CS, VC, VN		nt		CS, VC, VN		CS, VC, NS, VN, Ms		nt	
<i>N. tabacum</i> var. <i>macrophylla purpurea</i>	nt		CS, VC, NS, VN		nt		CS, VC, VN		CS, VC, VN		nt	
<i>N. tabacum</i> var. <i>chinensis</i>	nt		CS, VC, VN		nt		CS, VC, VN		VC, VN		nt	

Table 1 – cont.

Species	PVY <sup>W(-)</sup>		PVY <sup>W(+)</sup>		PVY <sup>NTN</sup> Pol(-)		PVY <sup>NTN</sup> Pol(+)		PVY <sup>NTN</sup> Ge(+)		PVY <sup>NZ</sup>	
	symptoms	ELISA	symptoms	ELISA	symptoms	ELISA	symptoms	ELISA	symptoms	ELISA	symptoms	ELISA
		1		2		1		2		1		2
<b>Subgenus: <i>Petunioides</i></b>												
<b>Section: <i>Undulatae</i></b>												
<i>N. undulata</i>	VC	+	VC, Df, Ms	-	ns	+	VC, Df, Ms	+	VC, Df, Ms	+	VC	+
<i>N. arentsi</i>	CS	+	CS	-	CS	+	CS	+	mVC	+	CS	+
<i>N. wigandioides</i>	nt	-	ns	-	nt	-	ns	-	nt	-	nt	-
<b>Section: <i>Trigonophyllae</i></b>												
<i>N. trigonophylla</i>	VC	+	VC	-	VC	+	VC	+	VC	+	VC	+
<i>N. palmerii</i>	VC	+	VC	-	VC	+	VC	+	mVC	+	Ms	+
<i>N. palmerii</i> (tetra)	nt	-	VC	-	nt	-	CS, VC	+	mVC, CS	+	nt	-
<b>Section: <i>Alatae</i></b>												
<i>N. sylvestris</i>	VC, VN	+	CS, VC, Df, Ms	-	VN, CS	+	CS, VC, Df, Ms	+	sevCS, VC, Df, Ms	+	VN, CS	+
<i>N. sylvestris</i> (tetra)	VC, VN	+	Df, Ms	-	VN, CS	+	Df, Ms	+	Df, Ms	+	VN, CS	+
<i>N. langsdorffi</i>	ns	+	CS, Df, Ms	-	CS, CR	+	Df, Ms	+	Df, Ms	+	CS	+
<i>N. alata</i>	VC	+	CS, Ms, mDf	-	VC, CS	+	CS, Ms, Df	+	sevCS, VC, Df, Ms	+	VC	+
<i>N. alata</i> (tetra)	nt	-	sevCS, mDf	-	nt	-	CS, VC, mDf	+	CS, VC, Df	+	nt	-
<i>N. alata</i> var. <i>alba</i>	nt	-	CS, Ms	-	nt	-	CS, Ms	+	CS, mVC, Ms	+	nt	-
<i>N. alata</i> var. <i>grandiflora</i>	nt	-	CS, Df, Ms, VN	-	nt	-	CS, Ms, sevDf	+	sevCS, Ms, sevDf	+	nt	-
<i>N. forgetiana</i>	VC	+	VC, Ms	-	CR	+	CS, VC, Ms	+	CS, VC, Ms	+	CR	+
<i>N. bonariensis</i>	VC	+	nt	-	CR	+	nt	+	nt	+	CR	+
<i>N. longiflora</i>	ns	-	Ms	-	CR, VN	+	CS, Ms	+	CR	+	CR, VN	+
<i>N. plumbaginifolia</i>	ns	+	CS, NS, sevDf, Ms	-	ns	+	CS, VC, NS, Df	+	CS, Df, Ms, VN	+	ns	+

Table 1 – cont.

Species	PVY <sup>W(-)</sup>		PVY <sup>W(+)</sup>		PVY <sup>NTN</sup> Pol(-)		PVY <sup>NTN</sup> Pol(+)		PVY <sup>NTN</sup> Ge(+)		PVY <sup>NZ</sup>	
	symptoms	ELISA	symptoms	ELISA	symptoms	ELISA	symptoms	ELISA	symptoms	ELISA	symptoms	ELISA
		1		2		1		2		1		2
<b>Section: Repandae</b>												
<i>N. repanda</i>	VC, VN	+	CS, VC, VN, NS, Df, Ms	+	VC, VN	+	CS, VN, NS, Df, Ms	+	CS, VN, NS, Df, Ms	+	VC, VN	+
<i>N. repanda</i> (tetra)	nt	-	CS, NS, VN, Df, Ms	-	nt	+	CS, NS, VN, Df, Ms	+	NS, VN, mDf, Ms	+	nt	+
<i>N. stictonii</i>	Ms	+	VC, CS	+	CS, CR	+	VC, CS	+	VC, CS	+	CS, VN	+
<i>N. nesophila</i>	VN, CR	+	CS, VC, Df, NS, Ms	+	CR, NR	+	CS, VC, NS, Df, sevMs	+	mVC	+	VN, CR	+
<b>Section: Noctiflorae</b>												
<i>N. noctiflora</i>	ns	-	nt	-	ns	+	nt	+	nt	-	ns	-
<i>N. petunioides</i>	ns	-	ns	-	CS, CR	+	ns	+	ns	-	ns	+
<b>Section: Acuminatae</b>												
<i>N. acuminata</i>	VC	+	CS, sevDf, VN, Ms	+	CR	+	CS, Df, Ms	+	CS, Df, VN, Ms	+	CR	+
<i>N. pauciflora</i>	CS	+	CS, VC, Df, VN	+	CS, NR	+	CS, Df, VN	+	CS, Df, VN	+	CS, NR	+
<i>N. attenuata</i>	VC	+	CS, NS, Ms, VN	+	VN, NS	+	CS, NS, Df, Ms, VN	+	CS, NS, Df, Ms, VN	+	CS	+
<i>N. miersii</i>	CS	+	Df, VN	+	CS, NS	+	sevDf, VN	+	Df, VN	+	CS, NS	+
<i>N. corymbosa</i>	ns	+	VC, VN	nt	CS	+	NS	nt	NS	nt	CS	+
<i>N. linearis</i>	nt	-	Df	+	nt	+	Df	+	CS, mDf	+	nt	+
<b>Section: Bigelovianae</b>												
<i>N. bigelovii</i>	nt	-	Df, sevMs	+	nt	+	sevDf, Ms	+	mDf, mMs	+	nt	+
<i>N. bigelovii</i> var. <i>multivalvis</i>	VC, VN	+	CS, Df	+	VN	+	CS, Df	+	Df	+	VN	+
<i>N. bigelovii</i> var. <i>bigelovii</i>	nt	-	Df, VN	+	nt	+	Df, VN	+	Df, Ms	+	nt	+
<i>N. bigelovii</i> var. <i>quadrivalvis</i>	nt	-	CS, VC, Df	+	nt	+	Df	+	CS, Df	nt	nt	+

Table 1 – cont.

Species	PVY <sup>W</sup> (-)		PVY <sup>W</sup> (+)		PVY <sup>NTN</sup> Pol(-)		PVY <sup>NTN</sup> Pol(+)		PVY <sup>NTN</sup> Ge(+)		PVY <sup>NZ</sup>	
	symptoms	ELISA	symptoms	ELISA	symptoms	ELISA	symptoms	ELISA	symptoms	ELISA	symptoms	ELISA
		1		2		1		2		1		2
<i>N. bigelovii</i> var. <i>wallacii</i>	nt	+	si	+	nt	nt	si	+	+	+	nt	+
<i>N. clevelandii</i>	VN	-	si	nt	si	nt	CS, mDf, Ms	+	+	+	VN, NR	+
<b>Section: Nudicaules</b>												
<i>N. nudicaulis</i>	Ms	+	Df, Ms	+	CS, CR	+	CS, Df, Ms	+	+	+	CS, CR	+
<b>Section: Suaveolentes</b>												
<i>N. benthamiana</i>	Ms	-	Df, Ms	+	sevMs	+	Df, Ms	+	+	+	Ms	+
<i>N. umbratica</i>	CS	-	mDf, Ms	+	Ns	+	mDf, Ms	+	+	+	CS	+
<i>N. cavicola</i>	Ms, CS	-	CS, Df, Ms	+	VN	+	VN, Ms	+	+	+	CS, NS	+
<i>N. debneyi</i>	VC, VY	-	CS, mDf, Ms	+	VY	+	mDf, Ms	+	+	+	VY	+
<i>N. gossei</i>	sevMs	+	VC, Df, Ms	+	VC, Ms	+	CS, VC, Df, Ms	+	+	+	VC, Ms	+
<i>N. amplexicaulis</i>	VC	+	CS, mMs, mDf	+	VC	+	CS, mMs, mDf	+	+	+	VC	+
<i>N. amplexicaulis</i> (tetra)	nt	-	CS, Ms, Df, NS	+	ns	+	CS, Ms, Df	+	+	+	nt	+
<i>N. maritima</i>	VC, Ms	+	CS, Df, Ms, VN	+	VN	+	CS, Df, dead	nt	nt	+	VN	+
<i>N. velutina</i>	VC	+	VC, mDf, Ms	+	VC	+	VC, CS, Df, VN	nt	nt	+	VC	+
<i>N. hesperis</i>	VN	+	VC, CS	+	VN	+	VC, CS	+	+	+	VN	+
<i>N. occidentalis</i>	CR, CS	+	CS, Df, Ms	+	CR, CS	+	CS, sevDf, Ms	+	+	+	CS	-
<i>N. simulans</i>	VN	+	CS, NS, sevDf, VN	+	VN, NR	+	CS, sevDf	+	+	+	VN	+
<i>N. megalosiphon</i>	VC, CR	+	sevDf, Ms	+	VC, VN	+	sevDf, Ms	+	+	+	VC, VN	+
<i>N. rotundifolia</i>	Ms	+	sevDf, m	+	sevMs	+	sevDf, Ms	+	+	+	sevMs	+
<i>N. excelsior</i>	VC, Ms	+	si	nt	VC, Ms	+	si	+	+	+	VC, Ms	+
<i>N. suaveolens</i>	VC	+	Df, NS, Ms	+	VC	+	Df, Ms	+	+	+	VC	+
<i>N. ingulba</i>	VN	+	CS, Df, Ms, VN	+	si	nt	Df, Ms	+	+	+	VN	+
<i>N. goodspeedii</i>	VC	+	mDf, mMs	+	VC, Ms	+	mDf, Ms	+	+	+	VC, Ms	+

Table 1 – cont.

Species	PVY <sup>W(-)</sup>		PVY <sup>W(+)</sup>		PVY <sup>NTN</sup> Pol(-)		PVY <sup>NTN</sup> Pol(+)		PVY <sup>NTN</sup> Ge(+)		PVY <sup>NZ</sup>	
	symptoms	ELISA		symptoms	ELISA		symptoms	ELISA		symptoms	ELISA	
		1	2		1	2		1	2		1	2
<i>N. africana</i>	ns	-	-	ns	-	-	ns	-	-	ns	-	-
<i>N. wuttkei</i>	VN	+	-	VN	+	sevDf, Ms	CS, Df, Ms	+	+	CS, Df, Ms	+	+
<i>N. exigua</i>	nt	-	-	nt	-	CS, Ms, mDf	CS, Ms, mDf	+	+	CS, VC, Ms, Df	+	+
<i>N. rosulata</i>	nt	-	nt	nt	nt	si	si	+	+	CS, Df, Ms, VN	+	+
<i>N. eastii</i>	nt	-	mCS, Ms, Df	nt	nt	CS, Ms, Df	CS, Ms, Df	+	+	CS, Df, Ms	+	+

Symptoms: CR – chlorotic rings, CS – chlorotic spots, Df – deformation, Ms – mosaic symptoms, NR – necrotic rings, NS – necrotic spots, si – systemic infection, VC – vein clearing, VN – vein necrosis, VY – vein yellowing.

ns – no symptoms, nt – not tested, m – mild, sev – severe.

ELISA 1 – tests using monoclonal antibodies against different PVY strains (MoAbs antiY), IgG112911; ELISA 2 – tests using monoclonal antibodies against the typical necrotic strain PVY<sup>N</sup> (MoAbs antiY<sup>N</sup>), IgG112712; “-” – virus detected by antibodies, “+” – virus undetected by antibodies.



toms included chlorotic spots and vein clearing. Less frequent were necrotic spots or mosaic-like discolorations.

*Tabacum* is the second subgenus and it is represented by two sections: *Tomentosae* and *Genuinae*.

The section *Tomentosae* comprises six 24-chromosome species naturally occurring in the eastern Andes in South America. All species of the section were included in PVY resistance tests (Table 1). *Nicotiana otophora* and *N. setchellii* resisted the challenge of three isolates: PVY<sup>NW</sup>(-), PVY<sup>NTN</sup>Pol(-) and PVY<sup>NZ</sup>, and the remaining isolates produced vein clearing and chlorotic spots. *Nicotiana tomentosa*, challenged with three isolates, succumbed only to PVY<sup>NZ</sup>. *Nicotiana tomentosiformis* and *N. kawakamii* turned out to be resistant only to PVY<sup>NW</sup>(-) and they responded with chlorotic spots, vein clearing and even with vein necrosis to the remaining isolates. Within that section, *N. glutinosa* was the most affected species.

The section *Genuinae* contains only one 48-chromosome species *N. tabacum*, but it comprises a large number of botanical and cultivated varieties. The species is a natural allopolyploid which arose through interspecific hybridization. The progenitors of cultivated tobacco include members of the section *Tomentosae* and *N. sylvestris*. Nine botanical varieties of *N. tabacum* were tested (Table 1) but only *N. tabacum* var. *xanthi* was exposed to all six isolates. All varieties responded with necrotic symptoms along with chlorotic spots and vein clearing resulting in a rapid death of plants.

The genus *Petunioides* is the third named by Goodspeed. At present, it comprises 60 species classified in six sections. Because of such a large number of species that subgenus is characterized by vast morphological, genetic diversity and also by diverse geographical distribution. Number of chromosomes for individual species varies from 18 to 48. The subgenus is represented by polyploid and aneuploid forms.

The section *Undulatae* is made up of three species: *N. undulata*, *N. arentsii* and *N. wigandioides*, which come from Bolivia and Peru. The former two were infected by the six isolates and responded mainly with vein clearing and chlorotic spots. In contrast, *N. wigandioides*, challenged only with two strains, PVY<sup>NW</sup>(+) and PVY<sup>NTN</sup>Pol(+) turned out to be resistant to both (Table 1).

The section *Trigonophyllae* is represented by two species, *N. trigonophylla* and *N. palmerii*, originating from Mexico and southern United States. Goodspeed (1954) classified them as two separate species but Wells (1960) recognized *N. palmerii* as a subspecies of *N. trigonophylla*. In addition, molecular studies showed both species to contain identical sequences of plastid DNA and nearly identical sequences of nrDNA ITS (Clarkson et al. 2004). Both species were included in the tests for resistance and both became infected developing vein clearing. The tetraploid variant of *N. palmerii* developed vein clearing and chlorotic spots (Table 1).

The section *Alatae* contains nine species with a chromosome number from 18 to 24. They are native to South America and are to be found specifically in Argentina, Bolivia, Paraguay, Uruguay and Brazil.

Seven species as well as tetraploid variants of *N. sylvestris* and *N. alata* along with two botanical varieties of *N. alata*, were tested for PVY resistance (Table 1). Both

variants of *N. sylvestris* were susceptible and developed the same symptoms of vein clearing and vein necrosis following exposure to PVY<sup>NW</sup>(-), PVY<sup>NZ</sup> and PVY<sup>NTN</sup>Pol(-). The remaining three isolates produced mainly leaf distortions and mosaic-like discolorations. *Nicotiana plumbaginifolia* did not show disease symptoms when challenged by the three above-mentioned isolates but the ELISA tests detected the presence of the virus in all plants inoculated with all six PVY isolates. All variants of *N. alata* responded with chlorotic discolorations which very often ran along the veins. The symptoms developed by the remaining species varied depending on the isolate used.

The species of the section *Repandae* come from Texas, Mexico and from the neighbouring islands. They contain 48 chromosomes in their somatic cells. Three species along with a tetraploid variant of *N. repanda* were tested. All were susceptible responding mainly with mosaic-like discolorations, chlorosis and necrosis (Table 1).

The section *Noctiflorae* is composed of five 24-chromosome species of which only two are to be found in the collection of Puławy and those two were inoculated. *Nicotiana noctiflora* did not succumb to any of the isolates used. *Nicotiana petunioides* resisted PVY<sup>NW</sup>(-), PVY<sup>NW</sup>(+) and PVY<sup>NTN</sup>Ge(+). When challenged with PVY<sup>NZ</sup> it did not develop symptoms, but the MoAbs antiY antibodies detected the presence of the virus in the sap (Table 1).

The section *Acuminatae* contains eight species with 24 chromosomes each. They originate from South America and from the United States. Six of the species were tested for resistance (Table 1). PVY symptoms varied with the species involved and with the challenging isolate but chlorotic spots prevailed. Severe infection was produced by the isolates PVY<sup>NW</sup>(+), PVY<sup>NTN</sup>Pol(+) and PVY<sup>NTN</sup>Ge(+) resulting in the development of necrosis in the majority of species.

Of the two 48-chromosome species that belong to the section *Bigelovianae*, *N. bigelovii* is native to California and *N. clevelandii* originates from the south-western United States and from the south-eastern part of Mexico. Both species were found to be susceptible to all PVY isolates, and especially *N. clevelandii* which developed systemic infection following exposure to PVY<sup>NTN</sup>Pol(-) and PVY<sup>NW</sup>(+) with total necrosis and death of all plants as a result (Table 1). Symptoms developed by *N. bigelovii* varied from variety to variety and *N. bigelovii* var. *wallacei* was the most severely affected developing acute systemic symptoms following exposure to all six isolates.

The sole species of the section *Nudicaules*, *N. nudicaulis* originating from north-western Mexico, was infected by all six PVY isolates.

The section *Suaveolentes* is the largest section in the genus *Nicotiana*. It contains 27 species the majority of which are indigenous to Australia and to several off-shore islands of the Pacific. One species comes from Africa. Such a large number makes the species extremely diversified phenotypically and genetically. Chromosome number for that group ranges from 32 to 48.

A total of 22 species and one tetraploid variant of the section *Suaveolentes* were included in testing for resistance to PVY (Table 1). An array of symptoms was observed depending on the species and the challenging isolate. *Nicotiana ingulba* was

found very sensitive, responding with severe necrosis when exposed to PVY<sup>NZ</sup> and with systemic symptoms and plant death following inoculation with PVY<sup>NTN</sup>Pol(-). Challenged with PVY<sup>NW</sup>(+) and PVY<sup>NTN</sup>Pol(+), *N. excelsior* and *N. rosulata* also responded with systemic infection. It is only one species, *N. africana*, that was completely resistant to all PVY isolates used. The high resistance of that species was also confirmed by ELISA tests.

The PVY isolates used in testing *Nicotiana* species for resistance showed different serological reactions and different capabilities to overcome resistance from different sources. When compared for the development and severity of symptoms, the strains PVY<sup>NW</sup>(-) and PVY<sup>NTN</sup>Pol(-) proved to be the least virulent. Both isolates were collected from susceptible cultivars and they failed to overcome *va* resistance. Consequently the tested species were infected by those strains much less frequently and the symptoms produced were relatively mild. Instead, the isolates PVY<sup>NW</sup>(+), PVY<sup>NTN</sup>Pol(+) as well as the necrotic strain PVY<sup>NZ</sup> collected from cultivars previously recognized as resistant and which overcame the resistance from sources within *N. tabacum*, proved to be much more virulent although the symptoms varied extensively. However, most of the time they produced necrotic lesions and in the majority of cases the level of infection was higher.

## Discussion

Evaluation for resistance to major strains and isolates of PVY of wild *Nicotiana* species, relatives of cultivated tobacco, is an important part of the valorisation of germplasm resources. This study allowed the verification of PVY resistance status in 68 *Nicotiana* species. Up to now it is only Sievert (1972), Głażewska (1977) and Burk et al. (1982) that made such attempts but their respective studies covered a smaller number of species. The differences in the results obtained may have been caused by different virus strains involved and different PVY detection methods used.

The tests done in this study gave evidence that, out of 96 tested entries, only five were fully resistant to all six isolates of *Potato virus Y* (PVY) belonging to three groups: PVY<sup>NW</sup>, PVY<sup>NZ</sup> and PVY<sup>NTN</sup>. The degree of resistance in the remaining accessions varied and depended, to a large extent, on the virulence of individual PVY strains.

Four resistant accessions: *N. raimondii*, tetraploid variant of *N. glauca* and diploid and tetraploid variants of *N. knightiana* belong to the subgenus *Rustica* and to the section *Paniculatae*. Those species have already been listed as immune by Sievert (1972) and by Głażewska (1977). Burk et al. (1982) reported mosaic-like symptoms in *N. knightiana* after inoculation with the strain PVY<sup>MM</sup>. That American strain was not used in this study. Diploid *N. glauca* did not show PVY symptoms and was resistant to five isolates but serological tests showed high concentration of the virus following inoculation with PVY<sup>NZ</sup>. That highly virulent strain was the only one to produce chlorotic rings in *N. benavidesii*, earlier recognized as a resistant

species (Sievert 1972, Głażewska 1977). *Nicotiana solanifolia* and *N. cordifolia*, declared as susceptible by Sievert (1972), in this study did not develop disease symptoms in response to three out of six isolates which was confirmed by ELISA. Conversely, *N. thyrsoiflora* (Sievert 1972) and *N. paniculata* (Głażewska 1977), named as immune by the two investigators, in this study were found highly susceptible to all six isolates.

Among the botanical varieties of *N. rustica*, *N. rustica* var. *brasilia* was the least susceptible and *N. rustica* var. *pumila* was somewhat more prone to infection.

The species of the section *Tomentosae* showed fairly high resistance although the response depended on the isolate. The above-cited Sievert (1972) named three species – *N. otophora*, *N. tomentosa* and *N. tomentosiformis* – as resistant whereas Głażewska (1977) put *N. setchelli* in place of Sievert's *N. tomentosa*. In this study all three above-mentioned species, as well as *N. kawakamii*, were resistant to at least one isolate whereas *N. otophora* and *N. setchelli* were resistant to three: PVY<sup>NW</sup>(–), PVY<sup>NTN</sup>Pol(–), PVY<sup>NZ</sup>. Burk et al. (1982) applied a biological test to show the presence of the PVY strain they had used in the sap of *N. otophora*. *Nicotiana glutinosa* was found fully susceptible to all challenging PVY isolates.

Of note are also *N. wigandoides* of the section *Undulatae* and *N. noctiflora* of the section *Noctiflorae*. The species were found to be resistant to the isolates used although the verification of that resistance with more PVY isolates would be desirable. Those two species were also reported as resistant by Sievert (1972). *Nicotiana petunioides*, another member of the section *Noctiflorae*, turned out to be susceptible to only two out of six isolates used in this study.

On the other hand, the resistance of *N. miersii*, reported by Sievert (1972), was not confirmed either by Głażewska (1977) or by the authors of this study.

As shown by the results of this survey, *N. africana*, classified in the subgenus *Petunioides*, was found to be the fifth immune species. The species was earlier reported as resistant by Burk et al. (1982) and by Lucas et al. (1980). Furthermore, the species was challenged with more than 40 PVY isolates from tobacco and from potato and succumbed to none (Doroszewska and Chrzanowska 2001, Doroszewska 2004). An attempt to breed the resistance from that species into cultivated tobacco allowed the development of breeding lines tolerant of all PVY isolates (Doroszewska 2009). Likewise, Lewis (2007) reported a tolerant response in the genotypes obtained through the transfer of PVY resistance from *N. africana*.

The results presented in this study allowed the selection of species which are the most resistant to diverse PVY isolates, namely they include *N. africana*, *N. glauca*, *N. raimondii*, *N. knightiana* and *N. benavidesii*. They can be used in the tobacco breeding oriented for creating new resistant cultivars.

## Streszczenie

### ODPORNOŚĆ DZIKICH GATUNKÓW RODZAJU *NICOTIANA* NA RÓŻNE IZOLATY PVY

Brunatna nekroza nerwów liści tytoniu powodowana przez wirus Y ziemniaka (*Potato virus Y*, PVY) jest chorobą o dużym znaczeniu gospodarczym. Pojawianie się nowych izolatów wirusa, zdolnych do przełamania odporności tytoniu, skłania do poszukiwania źródeł odporności pośród dzikich gatunków rodzaju *Nicotiana*.

Badania odpornościowe obejmowały 96 obiektów, w tym 68 gatunków oraz odmiany botaniczne i formy autotetraploidalne. Do badań użyto sześciu izolatów należących do trzech grup: PVY<sup>NW</sup>, PVY<sup>NZ</sup> i PVY<sup>NTN</sup>, różniących się charakterystyką serologiczną i zdolnością przełamania różnych źródeł odporności. Rośliny zakażano metodą inokulacji w warunkach szklarniowych. Prowadzono systematyczne obserwacje objawów chorobowych oraz wykonano testy DAS-ELISA, z użyciem dwóch rodzajów przeciwciał firmy Bioreba.

Obserwowano duże zróżnicowanie odporności gatunków na użyte izolaty. Najwięcej gatunków odpornych stwierdzono w obrębie sekcji *Paniculatae*. Całkowitą odpornością na PVY charakteryzowały się gatunki: *N. raimondii*, diploidalna i tetraploidalna forma *N. knightiana*, a także tetraploidalna *N. glauca*. Wysoce odporny okazał się również gatunek *N. benavidesii*, a także *N. wigandoides* i *N. noctiflora*. Wśród gatunków z podrodzaju *Petunioides* jedynie *N. africana* był odporny na wszystkie badane izolaty. Pozostałe gatunki uległy porażeniu w różnym stopniu w zależności od użytego izolatu, wykazując zróżnicowane objawy chorobowe i ich nasilenie.

## Literature

- Ano G., Blancard D., Cailleteau B., 1995: Mise au point sur la resistance recessive aux souches necrotiques du virus Y de la pomme de terre (PVY) presente chez *Nicotiana*. Ann. Tab. 27, 2: 35–42.
- Burbidge N.T., 1960: The Australian species of *Nicotiana* L. (*Solanaceae*). Aust. J. Bot. 8: 342–380.
- Burk L.G., Gooding G.V., Chaplin J.F., 1982: Reaction of *Nicotiana* species and cultivars or breeding lines of *Nicotiana tabacum* to three strains of potato virus Y. Tob. Sci. 28: 82–88.
- Carsten H., Seehofer F., 1960: How Virginia SCR is obtained and cultivated in Federal Republic of Germany. Inf. Bull. CORESTA 3: 39–43.
- Chase M.W., Knapp S., Cox A.V., Clarkson J.J., Butsko Ye., Joseph J., Savolainen V., Parokony A.S., 2003: Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (*Solanaceae*). Ann. Bot. 92, 1: 107–127.
- Chrzanowska M., Doroszewska T., 1997: Comparison between PVY isolates obtained from potato and tobacco plants grown in Poland. Phytopathol. Pol. 13: 63–71.
- Clarkson J.J., Knapp S., Garcia V.F., Olmstead R.C., Leitch A.R., Chase M.W., 2004: Phylogenetic relationship in *Nicotiana* (*Solanaceae*) inferred from multiple plastid DNA regions. Mol. Phylogenet. Evol. 33: 75–90.
- Doroszewska T., 2004: Krzyżowanie oddalone i transformacja genetyczna w uzyskiwaniu odporności tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) na wirusa Y ziemniaka (PVY). Monogr. Rozpr. Nauk. IUNG 9.

- Doroszewska T., 2007: Sub-group collaborative study on *Potato virus Y*. Annu. Subgr. Rep. CORESTA Vers. 26. [CD-ROM].
- Doroszewska T., 2008: Ocena odporności odmian i linii hodowlanych tytoniu na wirusa Y ziemniaka (PVY). Stud. Rap. IUNG-PIB 13: 29–42.
- Doroszewska T., 2009: Transfer of tolerance to different *Potato virus Y* (PVY) isolates from *Nicotiana africana* Merxm. to *Nicotiana tabacum* L. Plant Breed. 129: 76–81.
- Doroszewska T., Chrzanowska M., 2001: Characterization of the main PVY resistance sources to different PVY strains. Inf. Bull. CORESTA: 60.
- Doroszewska T., Verrier J.L., 2004: Sub-group collaborative study on *Potato virus Y*. Annu. Subgr. Rep. CORESTA Vers. 20. [CD-ROM].
- Gajos Z., 1971: Silnie wirulentny szczepek wirusa Y na tytoniu w Polsce, jego występowanie i właściwości w porównaniu ze szczepami nekrotycznym i zwykłym. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 115: 87–98.
- Głazewska Z., 1977: Odporność dzikich gatunków *Nicotiana* oraz odmian *N. tabacum* i *N. rustica* na nekrotyczne szczepy wirusa Y. Mater. XVII Ses. Nauk. Inst. Ochr. Rośl.: 277–287.
- Goodspeed T.H., 1954: The genus *Nicotiana*: origins, relationships and evolution of its species in the light of their distribution, morphology and cytogenetics. Chron. Bot. 21.
- Gugerli P., Fries P., 1983: Characterization of monoclonal antibodies to potato virus Y and their use for virus detection. J. Gen. Virol. 64: 2471–2477.
- Knapp S., Chase M.W., Clarkson J.J., 2004. Nomenclatural changes and a new sectional classification in *Nicotiana* (Solanaceae). Taxon 53, 1: 73–82.
- Koelle G., 1961: Genetische Analyse einer Y-virus (Rippenbraun) resistenten Mutante der Tabaksorte Virgin A. Zuchter 31: 71–72.
- Lewis R.S., 2007: Evaluation of *Nicotiana tabacum* genotypes possessing *Nicotiana africana*-derived genetic tolerance to Potato Virus Y. Crop Sci. 47: 1975–1984.
- Lucas G.B., Gooding G.V., Sasser J.N., Gerstel D.U., 1980: Reaction of *Nicotiana africana* to black shank, Granville wilt, tobacco mosaic virus and potato virus Y. Tob. Sci. 24: 141–142.
- Merxmüller H., Buttler L.P., 1975: *Nicotiana* in der Afrikanischen Namib – ein Pflanzen geographisches und phylogenetisches Ratsel. Mitt. Bot. München 2: 91–104.
- Sievert R.C., 1972: Sources of resistance to potato virus Y in the genus *Nicotiana*. Tob. Sci. 106: 92–94.
- Verrier J.L., Marchand V., Cailleteau B., Delon R., 2001: Chemical change and cigarette smoke mutagenicity increase associated with CMV-DTL and PVY-N infection in burley tobacco. In: Information Bulletin, Joint Meeting of the CORESTA, Agronomy & Phytopathology Study Groups. Cape Town, RPA: 57.
- Wells P.V., 1960: Variation in section *Trigonophyllae* of *Nicotiana*. Manda o 15: 148–151.
- Wen C., Wu Y., Li H., Wang H., Liu Q., 1999: Influences on photosynthesis and respiration of tobacco infected by potato virus Y – vein necrosis strain. In: Information Bulletin CORESTA. Suzhou, China: 10–11.
- Wernsman E.A., 1992: Sources of resistance to virus diseases. Inf. Bull. CORESTA 1–3/4: 113–119.

#### Authors' address:

**Prof. Dr. hab. Teresa Doroszewska, Anna Depta**, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Institute of Soil Science and Plant Cultivation – State Research Institute, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, Poland, e-mail: [dorter@iung.pulawy.pl](mailto:dorter@iung.pulawy.pl)

Accepted for publication: 15.12.2010

## 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<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>N</sup>. W uprawie tytoniu izolaty z grup PVY<sup>O</sup> i PVY<sup>C</sup> powodują słabe objawy w postaci mozaiki, zaś największe zagrożenie stanowią izolaty z grupy PVY<sup>N</sup>, które wywołują nekrozy nerwów liści tytoniu. Na podstawie objawów wywołanych na ziemniaku, grupę PVY<sup>N</sup> podzielono na izolaty PVY<sup>NW</sup> wywołujące słabe objawy mozaiki na liściach oraz PVY<sup>NTN</sup> powodujące nekrozę bulw (Chrzanowska, 1994; Le Romancer i in., 1994). Proste rozróżnienie grup PVY<sup>NW</sup> i PVY<sup>NTN</sup> 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 glauca*. 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<sup>N</sup>, Bioreba) i zaliczany jest do grupy izolatów PVY<sup>NW</sup>.
- **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<sup>N</sup>, Bioreba) i zaliczany jest do grupy izolatów PVY<sup>NW</sup>.
- **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<sup>N</sup>, Bioreba) i zaliczany jest do grupy izolatów PVY<sup>NW</sup>.
- **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<sup>NTN</sup>.

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, Berbeć (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.

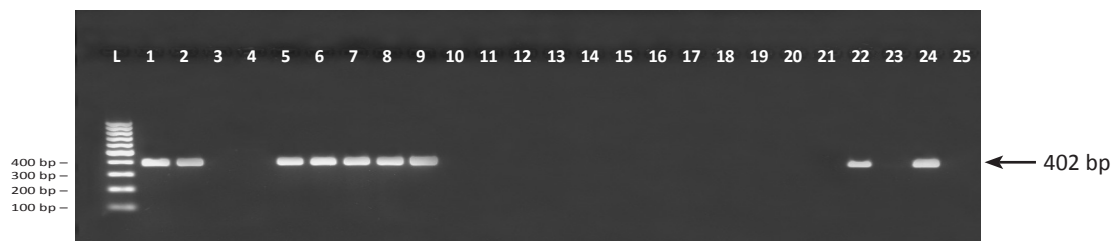
Izolację genomowego DNA wykonano metodą Doyle'a i Doyle (1987) z użyciem CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide; bromek cetylotrimetyloamoniowy). Oczyszczone i wysuszone DNA zawieszono w sterylnej wodzie destylowanej. Do amplifikacji DNA zastosowano reakcję PCR wykorzystując primery opisane przez Julio 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 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 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.

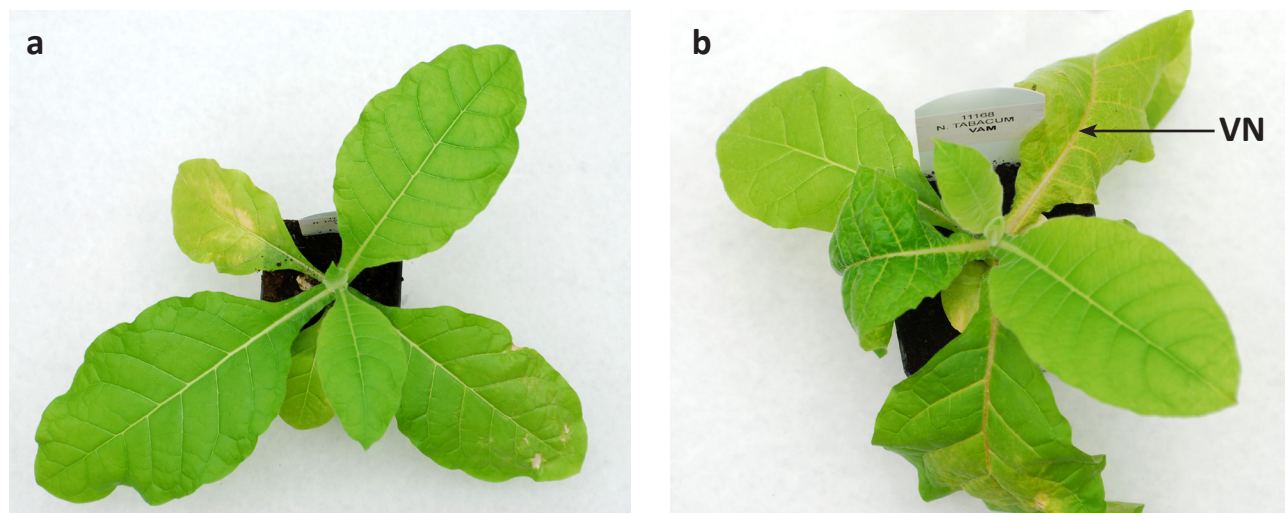
Odmiana Cultivar	Obecność markerów Presence of markers S10760E1 /Nsy1-eIF4E1	Reakcja roślin na inokulację izolatami PVY oraz wynik testu DAS-ELISA Plant reaction to inoculation with PVY isolates and result of DAS-ELISA							
		IUNG 23		IUNG 17		IUNG 22		IUNG20	
VAM	-/-	ns	-	ns	-	VN	+	VN	+
Wiślica	-/-	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



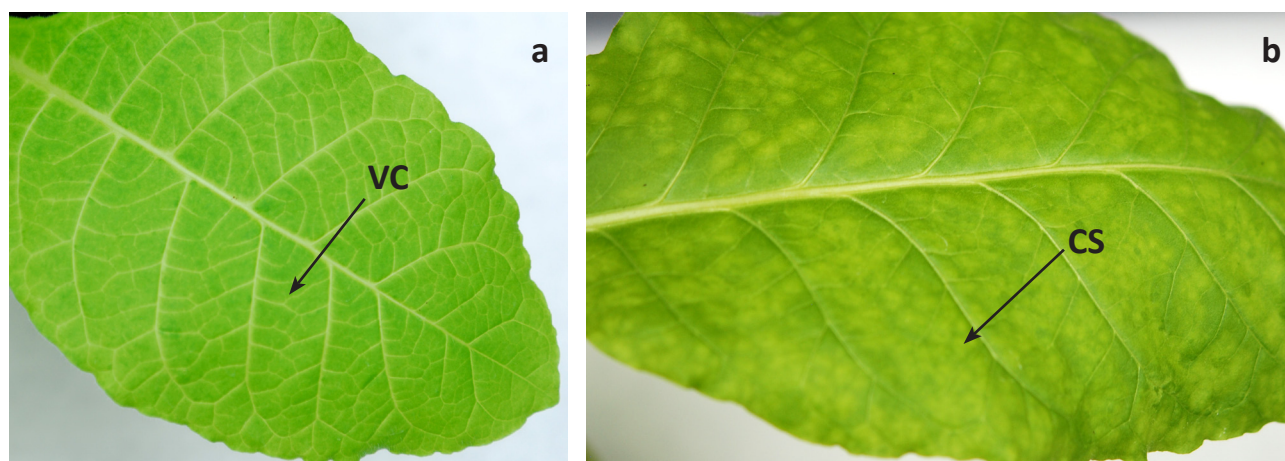
Rycina 2. Reakcja tytoniu odmiany VAM na dwa izolaty PVY (IUNG 23 i IUNG 20): brak objawów chorobowych po zastosowaniu słabego izolatu (a) i nekrozy nerwów po zastosowaniu izolatu silnego (b)

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<sup>NW</sup>, a 12 do PVY<sup>NTN</sup> 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<sup>NTN</sup> i jeden z grupy PVY<sup>NW</sup>. Odmiana Wiślica została porażona łącznie sześcioma izolatami. Najsłabszą odporność w cytowanej pracy wykazała odmiana V. SCR, która zareagowała objawami chorobowymi na 9 izolatów.

Julio i in. (2015) inokulowali izolatami z grupy PVY<sup>N</sup> 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<sup>N</sup> 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 (Doroszew-

ska, 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. Przypuszczalnie 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., Berbec 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-Manifacier 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<sup>N</sup> in *Nicotiana tabacum*: an assessment of the frequency of “*va*” breaking PVY<sup>N</sup> strains based on seven years of field survey on a worldwide basis. In: Proceedings of the 12<sup>th</sup> 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.

## Article

# Resistance Response of the Recently Discovered Species *Nicotiana mutabilis* to Potato virus Y (PVY) and Tomato spotted wilt virus (TSWV) Compared to Other Sources of Resistance

Anna Depta <sup>\*</sup>, Teresa Doroszevska  and Anna Czubacka

Institute of Soil Science and Plant Cultivation—State Research Institute, Czartoryskich 8 Str., 24-100 Puławy, Poland; dorter@iung.pulawy.pl (T.D.); annacz@iung.pulawy.pl (A.C.)

\* Correspondence: adepta@iung.pulawy.pl

**Abstract:** *Nicotiana mutabilis* is a recently discovered species within the genus *Nicotiana*. The aim of the present study was to evaluate its resistance to Potato virus Y (PVY) and Tomato spotted wilt virus (TSWV). Molecular analysis was performed to detect the *Va* gene determining susceptibility to PVY and the SCAR marker associated with resistance to TSWV. Resistance tests were carried out under greenhouse conditions through artificial inoculation with one TSWV and two PVY isolates. In order to confirm the presence of the viruses in plants, DAS-ELISA tests were performed using antibodies against PVY and TSWV. The results indicated the absence of the PVY susceptibility gene and the presence of the TSWV resistance gene in the genome of *N. mutabilis*. This species was considered tolerant to the two PVY isolates tested because, despite the positive DAS-ELISA results, the infected plants showed vein clearing and chlorotic spots but no vein necrosis. As a result of TSWV inoculation, *N. mutabilis* showed a hypersensitive response; however, after four months, 30% of the inoculated plants showed systemic infection. This species extends the genetic variation in the genus *Nicotiana* and, because of its tolerance to PVY and partial resistance to TSWV, it may be a potential source of resistance to these viruses.

**Keywords:** resistance; tolerance; *va* gene; SCAR marker



**Citation:** Depta, A.; Doroszevska, T.; Czubacka, A. Resistance Response of the Recently Discovered Species *Nicotiana mutabilis* to Potato virus Y (PVY) and Tomato spotted wilt virus (TSWV) Compared to Other Sources of Resistance. *Agronomy* **2021**, *11*, 1617. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081617>

Academic Editor: Vicente J. Febres

Received: 15 July 2021

Accepted: 12 August 2021

Published: 14 August 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Species of the genus *Nicotiana*, a member of the *Solanaceae* family, occur naturally throughout North and South America, Australia and Africa [1]. Individual species have been discovered and described over many years [2–5]. A great contribution to *Nicotiana* studies was made by T.H. Goodspeed [3], who also developed the *Nicotiana* classification that has been in force for more than 50 years. His research was based mainly on morphology and cytology and his classification of *Nicotiana* divided the genus into 3 subgenera and 14 sections. The current systematics of the genus *Nicotiana* has been developed based on molecular studies and indicates the existence of 76 species divided into 13 sections [6]. There are some discrepancies, however, regarding the number of species. Lewis and Nicholson reported that the genus *Nicotiana* had 70 species, as the rest were merely synonyms to other species within the genus [7]. The most recently discovered species of the genus *Nicotiana*, found in southern Brazil, is *Nicotiana mutabilis*. Under natural conditions, this species grows on forest edges, roadsides and abandoned fields. It is pollinated in the morning and evening hours by hummingbirds and has been shown to have 18 chromosomes and to be self-compatible. It has been included in the section *Alatae* [8].

Wild *Nicotiana* species are characterised by very high variability related to their occurrence, morphology and chromosome number. They also constitute a valuable reservoir of resistance/tolerance genes to biotic and abiotic factors [1].

Viral diseases pose a significant threat to tobacco cultivation because chemical protection is limited only to vector control. The duration of vector feeding and virus transmission,

however, is not always long enough for chemical protection to be effective. Many viral diseases are also developed due to mechanical infection. The most efficient way to counteract diseases, especially viral ones, is to develop genetic resistance. For this purpose, breeding work using desirable sources of resistance is necessary [9].

An economically important viral disease of tobacco is tobacco vein necrosis, caused by *Potato virus Y* (PVY). This virus is transmitted by aphids in a non-persistent manner. Disease symptoms initially include vein clearing and chlorotic spots, followed by vein necrosis on the leaves. This results in a significant reduction in yield and in the quality of the dried raw material [10,11]. *Potato virus Y*, which belongs to the genus *Potyvirus*, of the family *Potyviridae* [12,13], has a single sense RNA strand of about 9700 nucleotides in length [14,15]. *Potato virus Y* exists as a complex of strains, including a growing number of recombinants [16–18]. The classification of PVY isolates depends on biological, serological and molecular characteristics. According to the host from which they were originally collected, isolates have been classified into four different strains, corresponding to potato, pepper, tobacco and tomato strains. Based on the symptoms induced on tobacco and potatoes, PVY isolates have been divided into three main strains, PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup> and PVY<sup>N</sup> [17,18]. The PVY<sup>O</sup> strain (ordinary or common strain) induces a systemic mosaic in most potato cultivars and mild symptoms in tobacco cultivars. The PVY<sup>C</sup> strain causes stipple streak symptoms on potato cultivars, carrying the *Ns* resistance gene and non-necrotic symptoms on tobacco. The PVY<sup>N</sup> strain induces vein necrosis on *N. tabacum* and very mild mottling with occasional necrotic leaves on potato cultivars [19,20]. Isolates from the group PVY<sup>N</sup> were further divided into two subgroups, PVY<sup>NW</sup> and PVY<sup>NTN</sup>, and the differentiation between them is possible by using two types of antibodies produced by the Bioreba company [21]. The PVY<sup>NWi</sup> isolate was found in the potato cultivar Wilga [17]. This strain causes tobacco vein necrosis and possesses the capsid protein sequence of PVY<sup>O</sup> isolates. The PVY<sup>NTN</sup> isolates cause a tuber necrosis reaction on potato cultivars and vein necrosis on tobacco [20]. The variation within PVY isolates is due to numerous point mutations and recombinations between isolates [22,23]. The differentiation of the tobacco cultivars to PVY is determined by the dominant *Va* gene, whose product, the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E), interacts with the PVY genome-linked protein (VPg) [24,25]. Resistance to PVY within cultivated tobacco is determined by a single recessive *va* gene resulting from a deletion of the *eIF4E* gene located on chromosome 21 [26]. This deletion is a consequence of X-ray mutagenesis of the Virgin A [27] and, subsequently, this type of resistance is transferred to other tobacco cultivars through breeding. The durability of resistance determined by different types of mutations within the *eIF4E* gene depends on the size of the deletion [28]. There are PVY strains, however, that are capable of overcoming this resistance and infestation of varieties previously considered resistant is becoming increasingly common [29].

Some wild species of the genus *Nicotiana* possess resistance to PVY, therefore, they can be valuable material for resistance breeding [30,31]. Among them, *Nicotiana africana*, which belongs to the section *Suaveolentes*, deserves attention. During a study, in which more than 40 PVY isolates from tobacco and potatoes were used, this species was not infected by any of them [10,32]. Due to its immunity, *N. africana* has been used in breeding work. Wersman obtained an addition line, NC152, containing a pair of homologous chromosomes from *N. africana*, that was the result of a cross of this wild species with susceptible tobacco cultivar McNair944 [33]. This line was used by Lewis to assess the degree of gene transfer from *N. africana* both by classical breeding and by using *in vitro* cultures [34]. The nearly isogenic lines obtained by Lewis possessed both the recessive *va* gene and the *Nafr* fragment and showed varying levels of resistance, depending on the virulence of the used PVY isolate [35]. The chromosomal region *Nafr* introgressed into the tobacco genome did not provide complete resistance. Doroszevska [36] obtained the breeding line BPA (2n=48) by crossing the susceptible tobacco cultivar BP-210 with *N. africana*. This line was characterised as tolerant, since no vein necrosis occurred regardless of the applied PVY isolate, even if the virus was present in the plants [37]. BPA and *Nafr* introgression lines differ in the mode

of inheritance of PVY tolerance. According to Korbecka et al., the PVY tolerance in BPA is a recessive trait, while the *Nafr* gene is inherited in a partially dominant fashion [35,38].

Another very important viral disease of tobacco is tomato spotted wilt caused by the *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV), also known as *Lycopersicum virus 3*. This poses a significant threat to tobacco, as well as to many other species belonging to 85 botanical families [39]. This virus belongs to the genus *Orthotospovirus*, of the family *Tospoviridae* [40,41]. It is transmitted by several species of thrips [42], including tobacco thrips (*Thrips tabaci*). Initial disease symptoms include chlorotic and necrotic spots and, as the virus moves through the plant, there is stunted growth and a characteristic bending of the stem tip by about 45° [43]. TSWV causes a decrease in the yield of leaves, their quality and their technological usefulness. High intensity of infection may even necessitate plantation liquidation. The control of thrips is the most effective disease control strategy [44]. In the case of plants that are already infected with the virus, thrip control will not stop the development of the disease but may limit further spread. The only effective method of protecting tobacco against TSWV is the cultivation of resistant cultivars [9].

Within the genus *Nicotiana*, the species *Nicotiana alata* is considered as a potential source of resistance to TSWV because it develops a hypersensitive reaction to the virus, appearing as small necrotic spots on lower leaves. The necrosis of tissues prevents movement of the virus to higher parts of the plant [45–49]. The known resistance gene against TSWV, derived from *N. alata*, has been named *RTSW-al* [49]. It can be identified using the SCAR markers developed by Moon and Nicholson [50].

A hypersensitive reaction also occurs in the species *N. forgetiana*, belonging to the section *Alatae*, which is visible especially at the initial stages of infection, but, with time, plants become systemically infected [49].

*Nicotiana mutabilis*, discovered in 2002 [8], is of great interest to researchers. In fact, there are limited data in the literature on this species, especially regarding its disease resistance. The objective of this study was the evaluation of the *N. mutabilis* resistance against PVY and TSWV, which are the most economically important viral diseases for tobacco. Susceptibility to PVY and TSWV was determined using the *Va* gene and SCAR markers, respectively. Resistance in *N. mutabilis* was compared to that of related species, i.e., *N. alata* and *N. forgetiana*. Two cultivars of *N. tabacum* were used as susceptible controls.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant Material

The experimental species were:

- *Nicotiana mutabilis*, section *Alatae* [1];
- *Nicotiana alata*, section *Alatae*;
- *Nicotiana forgetiana*, section *Alatae*;
- *Nicotiana tabacum*, section *Nicotiana*. In our research, this species was represented by two cultivars:
  - Virginia A Mutant (VAM)—belongs to the light flue-cured type of tobacco [9]. Obtained by the action of X rays [51]. It has *va* resistance and is resistant to most PVY isolates, especially from the PVY<sup>NW</sup> group [20,52–54]. It is, however, susceptible to TSWV.
  - Burley 21—belongs to the light air-cured type of tobacco. Susceptible to all strains of PVY and to TSWV.

### 2.2. Resistance Tests

Biological tests aimed at assessing the resistance of the species *N. mutabilis* and other tested species to PVY and TSWV were performed by artificial inoculation in greenhouse conditions. Inoculation was carried out at the 5–6 leaf stage and three of the leaves were inoculated. Five species were used for the study and the number of tested plants depended on the species and the type of virus that was used for inoculation (Table 1). Three plants

for each species were used as controls. Both virus-inoculated and control plants were maintained under the same conditions in the greenhouse, which were as follows:

- temperature, 24 °C during the day/16 °C at night;
- light and darkness duration, 16 h light/8 h darkness.

**Table 1.** Species tested for resistance to PVY and TSWV, as well as the presence of molecular markers.

No.	Species	Number of Plants Tested with:		
		PVY IUNG 21	PVY IUNG 20	TSWV
1	<i>N. mutabilis</i>	20	20	40
2	<i>N. alata</i>	5	5	10
3	<i>N. forgetiana</i>	5	5	10
4	<i>N. tabacum</i> cv. VAM	5	5	10
5	<i>N. tabacum</i> cv. Burley 21	5	5	10

In the study for PVY resistance, two viral isolates of contrasting virulence were used:

- IUNG 21—mild isolate that does not break *va* resistance in the VAM cultivar. It is not detectable by monoclonal antibodies directed against the necrotic serotype (MoAbs anti Y<sup>N</sup> IgG 112511, Bioreba) [21];
- IUNG 20—severe isolate that breaks the *va* resistance of cultivar VAM. Detectable by two types of Bioreba antibodies (MoAbs anti Y IgG 112511 and MoAbs anti Y<sup>N</sup> IgG 112512) [21].

The source of TSWV and PVY inocula for all experiments was maintained in Samsun H tobacco plants. All kinds of inocula were prepared from leaves with visible disease symptoms. The presence of each virus in the sap of the tested plants was assayed by DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay). Samples of plant material with the confirmed presence of each virus (TSWV and PVY) were stored in an ultra-freezer at −80 °C.

The PVY inoculum consisted of leaves of infected plants, ground in a mortar with a small amount of distilled water. The TSWV inoculum preparation required a phosphate buffer (9.078 g/L of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 11.867 g/L of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) with 0.5% mercaptoethanol [55]. Infection of plants was carried out under the same conditions and in the same manner for both viruses. An appropriately prepared inoculum was rubbed on carborundum-strewn leaves of test plants at a volume of approximately 1 mL of inoculum per plant. The inoculated plants were protected from direct sunlight for 48 h. Plants inoculated only with buffer were also included in the study for comparison with virus-inoculated plants. Observation of disease symptoms and photographic documentation were systematically performed.

### 2.3. Serological Tests

In order to confirm the presence of a particular virus in plant tissues, serological tests were performed by DAS-ELISA using antibodies manufactured by Bioreba (Switzerland) and directed against PVY (catalogue no. 112511) and TSWV (catalogue no. 190115). For PVY, tests were performed once, four weeks after inoculation. Samples for ELISA from TSWV-infected plants were collected three times—after four weeks, after eight weeks and after four months from inoculation. The following were collected from different plant parts [9]:

- lower part included four lower leaves;
- middle part included four leaves above the lower part;
- upper part included the four youngest leaves on the plant.

DAS-ELISA tests were performed according to the manufacturer's protocol. Absorbance was measured at 405 nm on a Tecan Sunrise plate reader (Switzerland) 45 min after substrate application. The negative control was provided by the manufacturer and the positive control was a susceptible Samsun H plant infected with the appropriate virus.

#### 2.4. Molecular Tests

All plants tested for resistance to viruses were used in molecular analyses (Table 1). Isolation of genomic DNA was performed according to the method by Doyle and Doyle [56]. Total DNA was isolated from 200 mg of leaf tissue, which was previously homogenised with Qiagen Tissue Lyzer. Then, 1 mL of preheated (up to 60 °C) isolation buffer (100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB and 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol) was added. The samples were shaken vigorously for 5 s, incubated at 60 °C for 30 min, then cooled to room temperature. Next, the same volume of a mixture of chloroform: isoamyl alcohol (24:1 *v/v*) was added and the samples were shaken gently for 5 min, then centrifuged for 15 min at 4 °C and 14,000 rpm. The upper phase was transferred to a fresh Eppendorf tube and one volume of isopropanol was added. The samples were placed at –20 °C for 15 min, then gently shaken and centrifuged for 15 min. After discarding the supernatant, the remaining pellet was washed twice by pouring 600  $\mu$ L of 70% ethanol and centrifugation. The extracted DNA was vacuum-dried and resuspended in 20  $\mu$ L of sterile MiliQ water. The absorbance of samples was measured and a dilution of 20 ng/ $\mu$ L of DNA was obtained for all samples. The detection of resistance genes against PVY was carried out indirectly by detection of the susceptibility *Va* gene. For DNA amplification, PCR reactions were performed using primers detecting marker Nsyl-elf4E1 (forward primer, 5'-AATGCTTATTGTTAGCCTTTGTTTCT-3'; reverse primer, 5'-GTCAAGTGGCAGCCTTTCATA-3'), which amplified a 402 bp product [57]. Each 10  $\mu$ L of PCR reaction mixture contained 1  $\mu$ L of 20 ng/ $\mu$ L plant DNA and 6  $\mu$ L of True Allele PCR Premix buffer (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) containing polymerase, 0.15  $\mu$ L of each 10  $\mu$ M primer pair and 2.7  $\mu$ L of MiliQ sterile water. The PCR reactions included pre-denaturation for 10 min at 95 °C and 44 cycles with the following profile: 1 min at 95 °C, 1 min at 64 °C, 2 min at 72 °C and a final elongation for 7 min at 72 °C.

In order to detect the gene associated with TSWV resistance, the SCAR marker ACC/CCC 172 (forward primer, 5'-AGCTTCTTTCTCTCTCCATTTTT-3'; reverse primer, 5'-CAGAAGAAAACTGCTGGAGCTAT-3') [50] was amplified, giving a 117 bp product. The reaction mixture for PCR using the True Allele PCR Premix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) was identical to that for the *Va* gene. The PCR reactions included pre-denaturation for 3 min at 94 °C and 35 cycles with the following profile: 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C, 2 min at 72 °C and a final elongation for 7 min at 72 °C.

PCR products were analysed in 1.5% agarose gel in 1 $\times$ TBE buffer (100 mM Tris, 90 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA, pH of 8.5). The visualisation of electrophoretic separation results was performed in a transilluminator under UV light.

### 3. Results

#### 3.1. Resistance Response to PVY

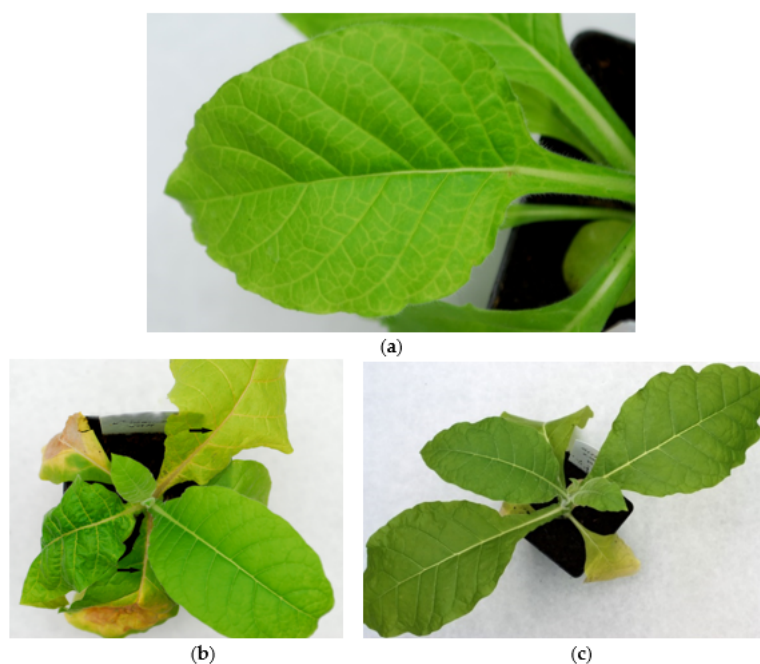
The tested species showed differences in symptom severity to PVY depending on the isolate used (Table 2). *Nicotiana mutabilis*, when infected with IUNG 20 (severe) and IUNG 21 (mild) isolates, showed vein clearing and no necrosis (Figure 1a). This symptom appeared 21 days post inoculation (dpi) and no other symptoms of disease occurred subsequently. The virus was detected by immunoassay four weeks after inoculation. In addition, in related species, *N. alata* and *N. forgetiana*, vein clearing was observed at 21 dpi. No additional disease symptoms were observed in *N. alata*. In *N. forgetiana*, the mild PVY isolate IUNG 21 caused vein clearing and leaf wrinkling at 28 dpi, while the severe PVY isolate IUNG 20 additionally caused mosaic leaf symptoms within the same length of time. Among the tested cultivars of *Nicotiana tabacum*, there were differences in response depending on the isolate used. Cultivar Burley 21, inoculated with the mild isolate, reacted

with vein clearing at 14 dpi and vein necrosis at 21 dpi. Inoculation with the severe PVY isolate, however, resulted in vein clearing earlier, at 7 dpi, and vein necrosis at 14 dpi. In cultivar Burley 21, the DAS-ELISA test gave a positive result after inoculation with the two isolates. In contrast, the cultivar VAM showed no disease symptoms after inoculation with the mild isolate, while the application of the severe isolate resulted in vein necrosis at 21 dpi (Figure 1b). For this cultivar, the virus was detected in the sap of plants infected only with the severe isolate. Plants inoculated only with buffer showed no disease symptoms (Figure 1c).

**Table 2.** Presence of the Nsyl-eIF4E1 marker characteristic for the *Va* gene responsible for susceptibility and the reaction of the tested species after inoculation with two PVY isolates.

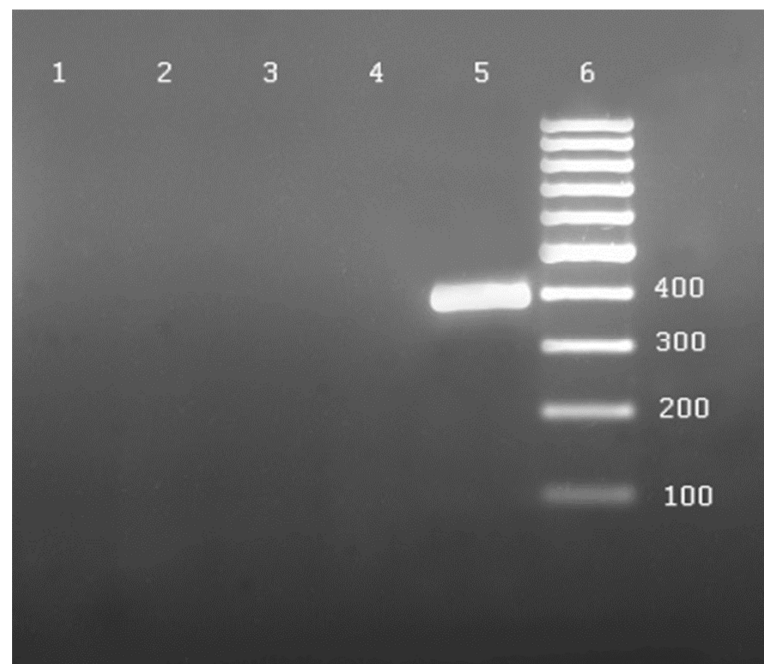
Species	Presence of Marker Nsyl-eIF4E1	PVY Isolate			
		IUNG 21 (Mild)		IUNG 20 (Severe)	
		Symptoms	DAS-ELISA Results	Symptoms	DAS-ELISA Results
<i>Nicotiana mutabilis</i>	–	VC	+	VC	+
<i>Nicotiana alata</i>	–	VC	+	VC	+
<i>Nicotiana forgetiana</i>	–	VC, WL	+	VC, WL, MS	+
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. VAM	–	ns	–	VN	+
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Burley 21	+	VN	+	VN	+

Legend: ns, no symptoms; VN, vein necrosis; VC, vein clearing; WL, wrinkled leaves; MS, mosaic symptoms; (+) positive, (–) negative results of the DAS-ELISA test. PVY isolates: IUNG 21, mild isolate that does not break *va* resistance in the VAM cultivar. It is not detectable by monoclonal antibodies directed against the necrotic serotype (MoAbs anti Y<sup>N</sup> IgG 112511, Bioreba). IUNG 20, severe isolate that breaks the *va* resistance of cultivar VAM. Detectable by two types of antibodies (MoAbs anti Y IgG 112511 and MoAbs anti Y<sup>N</sup> IgG 112512, Bioreba).



**Figure 1.** Resistance response of the tested species to the severe PVY isolate four weeks after inoculation: (a) vein clearing on leaves of *N. mutabilis*; (b) vein necrosis on tobacco cultivar VAM (indicated by black arrows); (c) control plant of cultivar VAM inoculated only with buffer.

Among the tested species, only *N. tabacum* cv. Burley 21 amplified the Nsyl-eIF4E1 marker, which indicated the presence of the *Va* susceptibility gene in this cultivar (Figure 2).



**Figure 2.** PCR products generated by amplification of the Nsyl-elf4E1 marker (402 bp) linked to the *Va* gene. Lanes:1, *N. mutabilis*; 2, *N. alata*; 3, *N. forgetiana*; 4, *N. tabacum* cv. VAM; 5, *N. tabacum* cv. Burley 21; 6, DNA ladder 100 bp.

### 3.2. Resistance Response to TSWV

The resistance response of *N. mutabilis* varied among plants at the same time points. Variations in the degree of infestation were also observed over time depending on the sampling date and the tested plant parts (Table 3).

**Table 3.** Resistance response of the tested species after TSWV inoculation depending on the sampling time and the part of the plant.

Species	Presence of Marker ACC/CCC 172	Time of Sampling	Leaves	No. of ELISA-Positive/ Tested Plants	Symptoms
<i>Nicotian mutabilis</i>	+	I	lower	39/40	NeS
			middle	30/40	CS/NeS
			upper	10/40	CS/NeS
		II	middle	31/40	CS/NeS
			upper	5/40	CS/NeS
		III	upper	12/40	CS/NeS
<i>Nicotiana alata</i>	+	I	lower	10/10	NeS
			middle	0/10	ns
			upper	0/10	ns
		II	middle	0/10	ns
			upper	0/10	ns
		III	upper	0/10	ns



Table 3. Cont.

Species	Presence of Marker ACC/CCC 172	Time of Sampling	Leaves	No. of ELISA-Positive/ Tested Plants	Symptoms
<i>Nicotian forgetiana</i>	+	I	lower	10/10	NeS
			middle	10/10	WL
			upper	10/10	St
		II	middle	10/10	WL
			upper	10/10	St
		III	upper	10/10	St
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. VAM	–	I	lower	10/10	VC/CS
			middle	10/10	VC/CS
			upper	10/10	St CA
		II	middle	10/10	VC/CS
			upper	10/10	St CA
		III	upper	10/10	St CA
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Burley 21	–	I	lower	10/10	VC/CS
			middle	10/10	VC/CS
			upper	10/10	St CA
		II	middle	10/10	VC/CS
			upper	10/10	St CA
		III	upper	10/10	St CA

Lines: NeS, necrotic spots; CS, chlorotic spots; ns, no symptoms; WL, wrinkled leaves; VC, vein clearing; St, stunting; CA, curving of the apex. Time of sampling: I, 4 weeks; II, 8 weeks; III, 4 months after inoculation.

At the first time point (I), that is, four weeks after infection, 97.5% of *N. mutabilis* plants showed symptoms of hypersensitivity in the form of necrotic spots on their lower inoculated leaves. Simultaneously, the presence of TSWV was confirmed by DAS-ELISA tests. Chlorotic spots (CS) (Figure 3a) were observed on the middle uninoculated leaves of 75% of the plants, which then developed into necrotic spots (NeS) (Figures 3b,c) and the virus was detected by antibodies. In the remaining 25% of plants, the leaves of the middle uninoculated part remained healthy. At the first sampling date, it was shown that, in only one out of every four plants, the virus was detected in the upper uninoculated part of the plant.

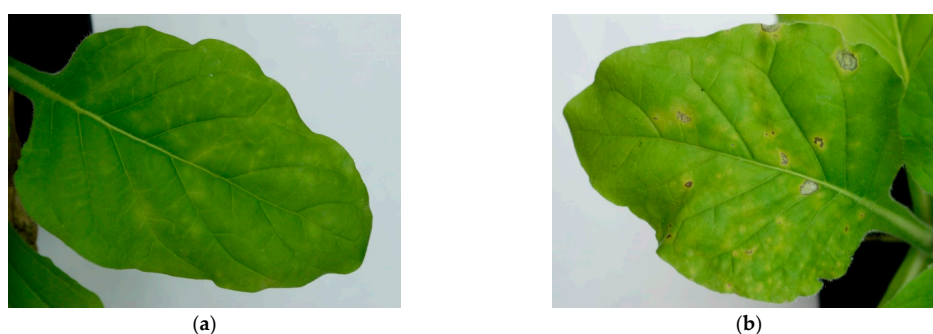


Figure 3. Cont.



**Figure 3.** Response of *Nicotiana mutabilis* to TSWV four weeks after inoculation: (a) chlorotic spots (CS); (b,c) chlorotic and necrotic spots (NeS); (d) mock inoculated plant without symptoms.

At the second time point (II), eight weeks after inoculation, only the middle and the upper leaves were examined, as those in the lower part of the plant had died. Our results showed that, in 77.5% of plants, the leaves of the middle uninoculated part were infected with TSWV, as evidenced by disease symptoms in the form of chlorotic and necrotic spots and a positive result of the DAS-ELISA test. Compared to time point I, the number of plants, for which the leaves from the upper uninoculated part showed disease symptoms, decreased to 12.5% and, in these plants, the virus was detected in the sap of the examined leaves.

At the third time point (III), four months after inoculation, samples were taken only from the upper uninoculated part, namely four of the youngest leaves at that particular time. The aim of the study was to determine whether the virus was still replicating and moving systematically beyond the necrotic tissue within the middle uninoculated part. Unfortunately, in 30% of the tested plants, chlorotic and necrotic spots were observed on the leaves of the upper uninoculated part and the presence of TSWV in these leaves was confirmed by DAS-ELISA. *N. mutabilis* plants inoculated only with buffer showed no disease symptoms (Figure 3d).

The other two species, *N. alata* and *N. forgetiana*, reacted differently from *N. mutabilis*. In the case of *N. alata*, typical hypersensitive symptoms in the form of necrotic spots were observed on the leaves of the lower segment of the inoculated plant four weeks after inoculation and the virus was serologically detected in that area (Figure 4). Conversely, leaves from the uninoculated middle and upper parts of plants of this species examined at time point I did not show any disease symptoms and the DAS-ELISA result was negative. Based on the results of the DAS-ELISA test, leaves collected after eight weeks and after four months were not infected by TSWV.

The course of infection was completely different in the case of *N. forgetiana*. Four weeks after inoculation, necrotic spots were noticed on the lower inoculated leaves of all ten tested plants, indicating a hypersensitive reaction. In this species, the uninoculated middle and upper leaves were also infected and the symptoms included leaf wrinkling and stunted plant growth (Figure 5). These symptoms also persisted at sampling dates II and III and the results of serological tests were positive for all samples.



**Figure 4.** Hypersensitive symptoms shown as necrotic spots on lower leaves of *N. alata* four weeks after inoculation with TSWV.



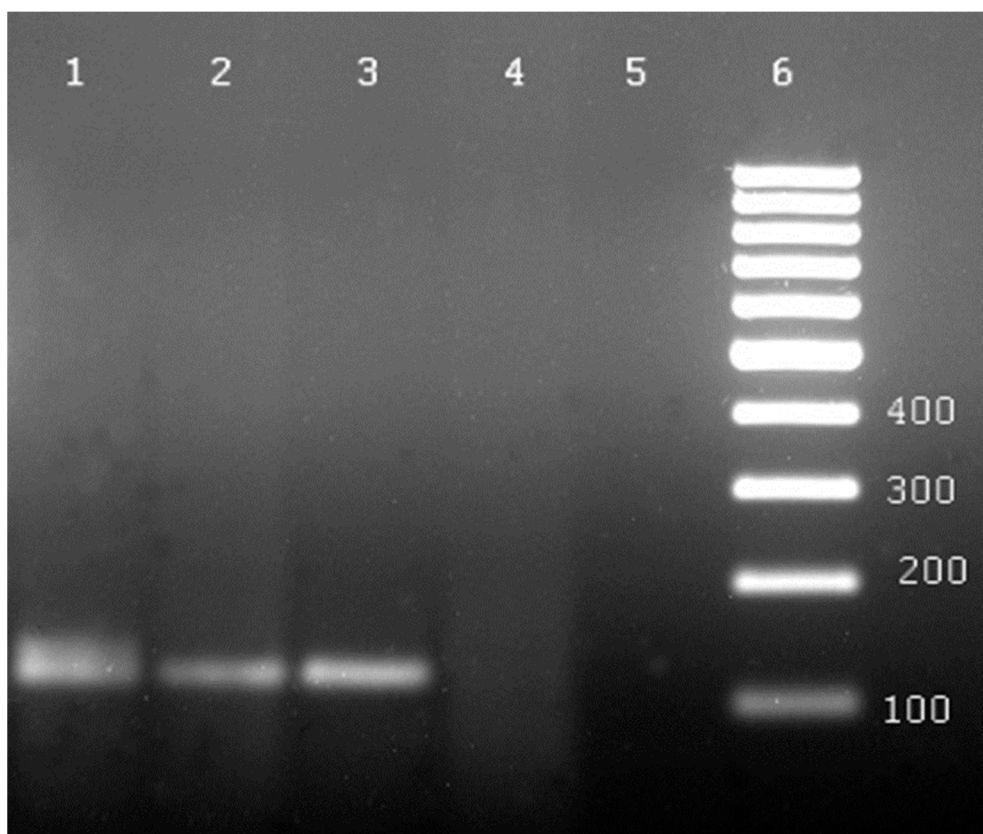
**Figure 5.** Wrinkled leaves and stunted growth as symptoms of TSWV infection in *N. forgetiana* species four weeks after inoculation.

Two cultivars of *Nicotiana tabacum*, VAM and Burley 21, were included for TSWV resistance testing and responded with severe infection of the entire plants regardless of sampling time (Figure 6). As early as four weeks after inoculation, vein clearing and chlorotic spots occurred on the lower and middle leaves, while a bent apex and stunted plant growth were noted at the upper part. This trend was also observed on two later dates. TSWV was detected in all samples collected. Plants inoculated only with buffer showed no disease symptoms.



**Figure 6.** Stunted growth, chlorotic and necrotic spots of (a) tobacco cv. Burley 21 and (b) tobacco cv. VAM four weeks after TSWV inoculation.

The ACC/CCC 172 marker associated with TSWV resistance was detected in all tested *N. mutabilis*, *N. alata* and *N. forgetiana* plants (Figure 7). The tested *Nicotiana tabacum* cultivars did not include this marker (Table 3).



**Figure 7.** Amplification profiles generated by SCAR marker ACC/CCC 172 (117 bp) linked with the TSWV resistance gene. Lanes: 1, *N. mutabilis*; 2, *N. alata*; 3, *N. forgetiana*; 4, *N. tabacum* cv. VAM; 5, *N. tabacum* cv. Burley 21; 6, DNA ladder 100 bp.

#### 4. Discussion

The evaluation of resistance to PVY showed differences in symptom severity among the tested species depending on the PVY isolate used. Upon inoculation with two PVY<sup>NW</sup> and PVY<sup>NTN</sup> isolates, *Nicotiana mutabilis* reacted with only mild symptoms in the form of vein clearing. Cardin and Moury [58] examined 30 *N. mutabilis* plants found in a nursery in the south of France. The tested plants showed mosaic symptoms and vein clearing on leaves. Electron microscope observations and DAS-ELISA tests indicated the presence of PVY and further tests showed the presence of the PVY<sup>C</sup> isolate. The resistance tests presented here by us are more detailed, because they were performed under controlled conditions. Moreover, two PVY isolates of different virulence were used. The molecular analysis of *N. mutabilis* did not reveal the presence of the Nsyl-eIF4E1 marker, indicating the absence of *Va*-type susceptibility. This was found in susceptible cultivar Burley 21, which showed vein necrosis as an effect of infection by both mild and severe isolates. PVY resistance of some *N. tabacum* cultivars is determined by a recessive *va* gene that resulted from a genomic deletion within the susceptibility gene [57]. No PCR product was amplified in the resistant cultivar VAM, confirming the deletion within the susceptibility gene *Va*. This cultivar, however, showed no disease symptoms after inoculation with the milder isolate, while the severe one caused necrosis.

Similar resistance response to that of *N. mutabilis* was observed in two other related species, i.e., *N. alata* and *N. forgetiana*. Previously, when infected with six PVY isolates, *N. alata* and *N. forgetiana* showed disease symptoms, such as vein clearing, chlorotic spots, mosaic discolouration and leaf deformations [31]. None of the isolates caused vein necrosis in species within the section *Alatae*. The absence of necrosis after PVY inoculation is a tolerance trait and also occurs within the species *N. tabacum*. In tolerant tobacco cultivars, such as Virginia SP278 and Zamojska 4, this trait is conferred by a single recessive gene, *NtTPN1* [28]. Since PCR products corresponding to the *va* gene were not identified in *N. mutabilis*, *N. alata* and *N. forgetiana*, the genetic basis of their tolerance to PVY remains unknown. Based only on the occurrence of similar symptoms, however, it can be assumed that *N. mutabilis* has a source of resistance similar to that of *N. alata* and *N. forgetiana*.

The response of the tested plants of *N. mutabilis* to TSWV varied depending on the sampling date, as well as the plant part. So far, there are very few data in the literature regarding the resistance of *N. mutabilis* to TSWV. The present study determined that this species reacted with hypersensitivity to TSWV, confirming the close affinity of *N. mutabilis* to the species *N. alata* and *N. forgetiana*, which belong to the same section [6]. Four weeks after inoculation, necrotic spots, indicative of a hypersensitive reaction, occurred on the lower leaves of 39 plants out of the 40 tested, on the middle leaves of 30 plants and on the upper leaves of 10 plants. The formation of necrotic spots was preceded by the appearance of chlorotic spots. After eight weeks, the leaves of the middle part of 31 plants were infected and only 5 plants had the virus in the leaves of the upper part. The fact that the youngest leaves were infected in fewer plants indicates virus retention in the lower leaves. Four months after inoculation, the virus was present in the upper leaves of 12 plants. This indicates that systemic infection of a plant may still occur long after inoculation.

A hypersensitive reaction also occurred in all tested *N. alata* and *N. forgetiana* plants. The disease symptoms of these two species, however, differed significantly with time. In the case of *N. alata*, necrotic spots occurred only on the lower leaves, while the rest remained healthy on all plants throughout the entire period of testing. The study by Laskowska et al. included seven populations of *N. alata* from different countries. The researchers indicated that all plants from two populations reacted only with a hypersensitive response. As for the rest, TSWV caused systemic infection of 6.3–50.0% of plants. The instability of this form of resistance is not fully explained. One reason may be the self-incompatibility of the studied species in the section *Alatae*, resulting in lack of full homozygosity [49]. The close relationship of *N. mutabilis* to *N. alata* may explain the similar differential resistance response to TSWV. Therefore, further genetic evaluation of *N. mutabilis* is desired. In *N. forgetiana*, which we tested in our study, despite the hypersensitivity reaction in the first

phase of infection, a systemic reaction occurred and TSWV was detected in the entire plant after four weeks. Previous research by Laskowska et al. [49] on the same species showed similar results.

Molecular studies have shown that the SCAR marker ACC/CCC 172 [50] associated with TSWV resistance is amplified in all tested *N. mutabilis* plants, as well as the other two species from the section *Alatae* examined here. Although the resistance response of these species is not identical, in all cases, hypersensitivity at the initial stage of infection was recorded. Simultaneously, marker ACC/CCC 172 was not detected in cultivated tobacco varieties that are susceptible to TSWV. Therefore, prospecting for sources of resistance to TSWV that could be used in tobacco breeding is very important.

Over the years, many attempts have been made to transfer TSWV resistance from *N. alata* to cultivated tobacco. Such work was undertaken by Gajos [59], who crossed *N. tabacum* with *N. alata*. As a result of the particular selection of breeding lines, he obtained a cultivar in the dark cigarette type—Polalta [60]—and a cultivar in the light cigarette type—Wiktoria [61]—which contained the resistance factor from *N. alata*. According to Yancheva [62], TSWV resistance from cv. Polalta was inherited as a single dominant gene, but the resulting hybrid plants showed morphological deformations which significantly limited the possibility of using this source of resistance in breeding. Later attempts to transfer resistance genes from *Nicotiana alata* to cultivated tobacco were made on multiple occasions [63–66].

As shown by the authors of the studies cited, obtaining cultivars resistant to TSWV is extremely important, but also very difficult. Previous work has solely focused on resistance derived from *N. alata*. The aim of our study was to evaluate the resistance of a recently discovered and, thus far, untested species. The affinity of *N. mutabilis* to *N. alata* and the confirmed presence of the SCAR marker ACC/CCC 172 indicate the need for more extensive studies. This is the first time such a detailed resistance test of *N. mutabilis* has been carried out and our results show that this species can be used as a potential source of resistance to TSWV, thus expanding the pool of genetic variability.

## 5. Conclusions

Tests for PVY resistance showed that the species *N. mutabilis* was tolerant to two PVY strains. Evaluation of resistance to TSWV demonstrated the hypersensitive reaction of this species but, nevertheless, the systemic infection of some plants was also observed. Due to PVY tolerance and its partial resistance to TSWV, *N. mutabilis* may be a potential source of resistance in tobacco breeding.

**Author Contributions:** Conceptualisation, A.D.; methodology, A.D. and A.C.; validation, A.D.; formal analysis, A.D., T.D. and A.C.; investigation, A.D., T.D. and A.C.; resources, A.D., T.D. and A.C.; data curation, A.D.; writing—original draft preparation, A.D.; writing—review and editing, A.C. and T.D.; visualisation, A.D.; supervision, T.D.; project administration, A.D. and A.C.; funding acquisition, T.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The study was financed by a targeted grant from the Ministry of Agriculture and Rural Development for 2021 in the area “Protection of plant genetic resources of agricultural plants” coordinated by the Institute of Plant Breeding and Acclimatization—National Research Institute.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Doroszewska, T.; Depta, A.; Czubacka, A. *Album of Nicotiana Species*; Institute of Soil Science and Plant Cultivation: Puławy, Poland, 2009.
2. Kostoff, D. The origin of the tetraploid *Nicotiana* from Bathurst. *Cur. Sci.* **1939**, *8*, 110–111.

3. Goodspeed, T.H. *The genus Nicotiana*; Chronica Botanica: Waltham, MA, USA, 1954.
4. Burbidge, N.T. The Australian species of *Nicotiana* L. (*Solanaceae*). *Aust. J. Bot.* **1960**, *8*, 342–380. [[CrossRef](#)]
5. Merxmüller, H.; Buttler, L.P. *Nicotiana* in der Afrikanischen Namib-Ein Pflanzen geographisches und phylogenetisches Ratsel. *Ill. Bot.* **1975**, *12*, 91–104.
6. Knapp, S.; Chase, M.; Clarkson, J.J. Nomenclatural changes and a new sectional classification in *Nicotiana* (*Solanaceae*). *Taxon* **2004**, *53*, 73–82. [[CrossRef](#)]
7. Lewis, R.S.; Nicholson, J.S. Aspects of the evolution of *Nicotiana tabacum* L. and the status of the United States *Nicotiana* Germplasm Collection. *Genet. Resour. Crop Evol.* **2007**, *54*, 727–740. [[CrossRef](#)]
8. Stehmann, J.R.; Semir, J.; Ippolito, A. *Nicotiana mutabilis* (*Solanaceae*), a new species from southern Brazil. *Kew Bull.* **2002**, *57*, 639–646. [[CrossRef](#)]
9. Doroszewska, T.; Berbeć, A. *Methodology of Tobacco Integrated Pest Management*; Institute of Soil Science and Plant Cultivation: Puławy, Poland, 2015. (In Polish)
10. Doroszewska, T. *Wide Hybridization and Genetic Transformation in Breeding for Resistance to Potato virus Y (PVY) in Tobacco (Nicotiana tabacum L.)*; Institute of Soil Science and Plant Cultivation: Puławy, Poland, 2004.
11. Scholthof, K.B.K.; Adkins, S.; Czosnek, H.; Palukaitis, P.; Jacquot, E.; Hohn, T.; Hohn, B.; Saunders, K.; Candresse, T.; Ahlquist, P.; et al. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **2011**, *12*, 938–954. [[CrossRef](#)]
12. Simmonds, P.; Aiewsakun, P. Virus classification—Where do you draw the line? *Arch. Virol.* **2018**, *163*, 2037–2046. [[CrossRef](#)]
13. Gorbalenya, A.E.; Krupovic, M.; Mushegian, A.; Kropinski, A.M.; Siddell, S.G.; Varsani, A.; Adams, M.J.; Davison, A.J.; Dutilh, B.E.; Harrach, B.; et al. The new scope of virus taxonomy: Partitioning the virosphere into 15 hierarchical ranks. *Nat. Microbiol.* **2020**, *5*, 668–674.
14. Robaglia, C.; Durand-Tardif, M.; Tronchet, M.; Boudazin, G.; Astier-Manifacier, S.; Casse-Delbart, F. Nucleotide sequence of *Potato virus Y* (N strain) genomic RNA. *J. Gen. Virol.* **1989**, *70*, 935–947. [[CrossRef](#)]
15. Thole, V.; Dalmay, T.; Burgyan, J.; Balazs, E. Cloning and sequencing of *Potato virus Y* (Hungarian isolate) genomic RNA. *Gene* **1993**, *123*, 149–156. [[CrossRef](#)]
16. Green, K.J.; Brown, C.J.; Gray, S.M.; Karasev, A.V. Phylogenetic study of recombinant strains of *Potato virus Y*. *Virology* **2017**, *507*, 40–52. [[CrossRef](#)]
17. Chrzanowska, M. Differentiation of *Potato virus Y* (PVY) isolates. *Phytopathol. Pol.* **1994**, *8*, 15–20.
18. Le Romancer, M.; Kerlan, C.; Nedellec, M. Biological characterization of various geographical isolates of *Potato virus Y* inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathol.* **1994**, *43*, 138–144. [[CrossRef](#)]
19. Tribodet, M.; Glais, L.; Kerlan, C.; Jacquot, E. Characterization of *Potato virus Y* (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVY<sup>N</sup> isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *J. Gen. Virol.* **2005**, *86*, 2101–2105. [[CrossRef](#)]
20. Crosslin, J.M. PVY: An Old Enemy and A Continuing Challenge. *Am. J. Potato Res.* **2013**, *90*, 2–6. [[CrossRef](#)]
21. Gugerli, P.; Fries, P. Characterization of monoclonal antibodies to *Potato virus Y* and their use for virus detection. *J. Gen. Virol.* **1983**, *64*, 2471–2477. [[CrossRef](#)]
22. Drake, J.W. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 4171–4175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Przybyś, M.; Doroszewska, T.; Berbeć, A. Point mutation in the viral genome-linked protein (VPg) of *Potato virus Y* probably correspond with ability to overcome resistance of tobacco. *J. Food Agric. Environ.* **2013**, *11*, 986–989.
24. Dluge, K.L.; Song, Z.; Wang, B.; Steede, W.T.; Xiao, B.; Liu, Y.; Dewey, R.E. Characterization of *Nicotiana tabacum* genotypes possessing deletion mutations that affect potyvirus resistance and the production of trichome exudates. *BMC Genom.* **2018**, *19*, 484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Ruyi, R.; Qiang, Z.; Futai, N.; Qiu, J.; Wuiqing, W.; Jicheng, W. Breeding for PVY resistance in tobacco LJ911 using CRISPR/Cas9 technology. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* **2021**, *21*, e31682116. [[CrossRef](#)]
26. Julio, E.; Cotucheau, J.; Decorps, C.; Volpatti, R.; Sentenac, C.; Candresse, T.; Dorlhac de Borne, F. A eucariotic translation initiation factor 4E (eIF4E) is responsible for the “va” tobacco recessive resistance to potyviruses. *Plant. Mol. Biol. Rep.* **2015**, *33*, 609–623. [[CrossRef](#)]
27. Koelle, G. Versucherzur Vererbung der Krankheitsresistenz bei Tabak. 2 Mitt. Eine Rippen-braune-resistente Virgin A Mutante nach Anwendung kunstlicher Mutations auslosung durch Rontgenstrahlen. *Table Forsch.* **1958**, *24*, 83–84.
28. Michel, V.; Julio, E.; Candresse, T.; Cotucheau, J.; Decorps, C.; Volpatti, R.; Moury, B.; Glais, L.; Dorlhac de Borne, F.; Decroocq, V.; et al. NtTPN: A RPP8-like R gene required for *Potato virus Y*-induced veinal necrosis in tobacco. *Plant J.* **2018**, *95*, 700–714. [[CrossRef](#)]
29. Verrier, J.L.; Doroszewska, T. Tobacco Virus Collaborative Study (1996–2011) VIR Technical Report. 2018. Available online: [https://www.coresta.org/documents/search?f%5B0%5D=im\\_field\\_technical\\_document\\_type%3A36193&page=5](https://www.coresta.org/documents/search?f%5B0%5D=im_field_technical_document_type%3A36193&page=5) (accessed on 1 August 2018).
30. Sievert, R.C. Sources of resistance to *Potato virus Y* in the genus *Nicotiana*. *Tob. Sci.* **1972**, *106*, 92–94.
31. Doroszewska, T.; Depta, A. Resistance of wild *Nicotiana* species to different PVY isolates. *Phytopathologia* **2011**, *59*, 9–24.
32. Doroszewska, T.; Chrzanowska, M. Characterization of the main PVY resistance sources to different PVY strains. *Inf. Bull. Coresta* **2001**, *60*, 21–27.

33. Wersman, E.A. Varied Roles of the Haploid Sporophyte in Plant Improvement. In *Plant Breeding in the 1990s*; Stalker, H.T., Murphy, J.P., Raleigh, N.C., Eds.; CABI Publ.: Wallingford, UK, 1992; pp. 461–484.
34. Lewis, R.S. Transfer of resistance to *Potato virus Y* (PVY) from *Nicotiana africana* to *Nicotiana tabacum*: Possible influence of tissue culture on the rate of introgression. *Theor. Appl. Genet.* **2005**, *110*, 678–687. [[CrossRef](#)]
35. Lewis, R.S. Evaluation of *Nicotiana tabacum* genotypes possessing *Nicotiana africana*-derived genetic tolerance to *Potato Virus Y*. *Crop Sci.* **2007**, *47*, 1975–1984. [[CrossRef](#)]
36. Doroszewska, T. Transfer of tolerance to different *Potato virus Y* (PVY) isolates from *Nicotiana Africana* Merxm. to *Nicotiana tabacum* L. *Plant Breed.* **2010**, *129*, 76–81. [[CrossRef](#)]
37. Korbecka-Glinka, G.; Czubacka, A.; Przybyś, M.; Doroszewska, T. Resistance vs. tolerance to *Potato virus Y* in tobacco—Comparing effectiveness using virus isolates from Central Europe. *Breed. Sci.* **2017**, *67*, 459–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Korbecka-Glinka, G.; Czubacka, A.; Depta, A.; Doroszewska, T. Inheritance of *Potato virus Y* tolerance introgressed from *Nicotiana africana* to cultivated tobacco. *Pol. J. Agron.* **2017**, *31*, 39–44.
39. Parella, G.; Gognalons, P.; Gebre-Sellassie, K.; Vovlas, C.; Marchoux, G. An update of the host range of *Tomato spotted wilt virus*. *J. Plant Pathol.* **2003**, *85*, 227–264.
40. Francki, R.I.B.; Fauquet, C.M.; Knudson, D.D.; Brown, F. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* **1991**, *2*, 1–450.
41. Wijkamp, I.; Van Lent, J.; Kormelink, R.; Goldbach, R.; Peters, D. Multiplication of *Tomato spotted wilt virus* in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *J. Gen. Virol.* **1993**, *74*, 341–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Jones, D.R. Plant viruses transmitted by thrips. *Eur. J. Plant Pathol.* **2005**, *113*, 119–157. [[CrossRef](#)]
43. Mumford, R.A.; Barker, I.; Wood, K.R. The biology of the tospoviruses. *Ann. Appl. Biol.* **1996**, *128*, 159–183. [[CrossRef](#)]
44. Doroszewska, T.; Berbeć, A.; Czarnecka, D.; Kawka, M. *Diseases and Pests of Tobacco*; Institute of Soil Science and Plant Cultivation: Puławy, Poland, 2013.
45. Ivancheva-Gabrovska, T. Sources of resistance to *Tomato spotted wilt virus* and *Thrips tabaci* Lind. *Spec. CORESTA Bull Symp. Sofia* **1978**, *96*.
46. Jankowski, F. Sources of resistance to TSWV (*Lycopersicum virus 3*) among uncultivated species of *Nicotiana* genus. *Biul. CLPT* **1980**, *1–2*, 3–8.
47. Kovalenko, A.G.; Rud, E.A.; Strelyaeva, N.I.; Oleshchenko, L.T. Responses of tobacco varieties, wild species and interspecies hybrids on artificial infection with *Tomato spotted wilt virus*. *Mikrobiol. Zhurnal.* **1987**, *49*, 85–89.
48. Palakarcheva, M.; Yancheva, A. Genetic sources of resistance to tomato bronziness pathogen on tobacco in wild species of the genus *Nicotiana*. *Genet Breed* **1989**, *22*, 473–479. (In Bulgarian)
49. Laskowska, D.; Doroszewska, T.; Depta, A.; Kurza, K.; Olszak-Przybyś, H.; Czubacka, A. A survey of *Nicotiana* germplasm for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). *Euphytica* **2013**, *193*, 207–219. [[CrossRef](#)]
50. Moon, H.; Nicholson, J.S. AFLP and SCAR markers linked to *Tomato Spotted Wilt Virus* resistance in tobacco. *Crop Sci.* **2007**, *47*, 1887–1894. [[CrossRef](#)]
51. Koelle, G. Genetische Analyse einer Y-virus (Rippen-braune) resistenten Mutante der Tabaksorte Virginia. *Zuchter* **1961**, *31*, 71–72.
52. Chrzanowska, M.; Doroszewska, T. Comparison between PVY isolates obtained from potato and tobacco plants in Poland. *Phytopathol. Pol.* **1997**, *13*, 63–71.
53. Doroszewska, T.; Verrier, J.L. *Sub-Group Collaborative Study on Potato Virus Y*; Annual Subgroup Report; CORESTA CD-ROM Version. 20; Paris, France, 2004.
54. Verrier, J.L. *PVY Collaborative Experiment. Results*; Altadis, Insitute du Tabac: Bergerac, France, 2001.
55. Tsakiridis, J.P.; Gooding, G.V. *Tomato spotted wilt virus* in Greece. *Phytopathol. Mediterr.* **1972**, *11*, 42–47.
56. Doyle, J.J.; Doyle, J.L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* **1987**, *19*, 11–15.
57. Sierro, N.; Battey, J.N.D.; Ouadi, S.; Bakaher, N.; Bovet, L.; Willing, A.; Geopfert, S.; Peitsch, M.C.; Ivanov, N.V. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3833. [[CrossRef](#)]
58. Cardin, L.; Moury, B. First Report of *Potato virus Y* in *Nicotiana mutabilis* in France. *Plant Dis.* **2008**, *92*, 312. [[CrossRef](#)]
59. Gajos, Z. Inheritance of resistance to *Tomato spotted wilt virus* in interspecies hybrids of *Nicotiana tabacum* × *Nicotiana alata* Link. *Zesz. Prob. Post. Nauk Rol.* **1981**, *244*, 117–126.
60. Gajos, Z. Polalta, the first Polish tobacco variety resistant to *Tomato spotted wilt virus* was released for regional experimentation and propagation. *Wiad. Tytoniowe.* **1987**, *31*, 11–17.
61. Gajos, Z. Virginia ZG-4 (Wiktorija)—A new tobacco variety resistant to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) and black root rot (*Thielaviopsis basicola* Ferr.). *Biul. CLPT* **1993**, *1–4*, 5–19.
62. Yancheva, A.A. Possibility for transferring combined resistance to *Tomato spotted wilt virus* and *Thielaviopsis basicola* to intercultivar tobacco hybrids. *Genet. Breed.* **1990**, *23*, 194–199. (In Bulgarian)
63. Berbeć, A. Cytological study on *Nicotiana tabacum* L. cv. Nadwiślański Mały (2× and 4×) × *Nicotiana alata* Link et Otto hybrids. *Genet. Pol.* **1987**, *28*, 251–261.
64. Laskowska, D.; Berbeć, A. Cytology and fertility of viable hybrids of *Nicotiana tabacum* L. cv. TB-566 with *N. alata* Link et Otto. *J. Appl. Genet.* **2005**, *46*, 11–18.



- 
65. Laskowska, D.; Berbeć, A. Resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in *Nicotiana alata* and *N. sanderae* and in hybrids between *N. tabacum* and *N. alata*. *Plant Breed. Seed Sci.* **2006**, *54*, 91–100.
  66. Laskowska, D.; Berbeć, A. TSWV resistance in DH lines of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from a hybrid between 'Polalta' and 'Wiślica'. *Plant Breed.* **2010**, *129*, 731–733. [[CrossRef](#)]

# *A survey of Nicotiana germplasm for resistance to Tomato spotted wilt virus (TSWV)*

**Dorota Laskowska, Teresa Doroszevska, Anna Depta, Karolina Kursa, Hanna Olszak-Przybyś & Anna Czubacka**

**Euphytica**  
International Journal of Plant Breeding

ISSN 0014-2336

Euphytica  
DOI 10.1007/s10681-013-0921-3



**ONLINE  
FIRST**

**Euphytica**

**Your article is published under the Creative Commons Attribution license which allows users to read, copy, distribute and make derivative works, as long as the author of the original work is cited. You may self-archive this article on your own website, an institutional repository or funder's repository and make it publicly available immediately.**

# A survey of *Nicotiana* germplasm for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)

Dorota Laskowska · Teresa Doroszevska ·  
Anna Depta · Karolina Kursa ·  
Hanna Olszak-Przybyś · Anna Czubacka

Received: 24 November 2012 / Accepted: 3 April 2013  
© The Author(s) 2013. This article is published with open access at Springerlink.com

**Abstract** The reaction to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) was evaluated in 94 accessions of *Nicotiana*, originating from the Institute of Soil Science and Plant Cultivation tobacco germplasm collection in Puławy, Poland. Tests for resistance were conducted under greenhouse conditions using single TSWV isolate collected from tobacco plantation in Lublin district, Poland. The presence of the virus was verified using DAS-ELISA. SCAR markers associated with TSWV resistance gene were applied. The members of the section *Alatae*, the genus *Nicotiana*: *N. alata*, *N. forgetiana*, and *Nicotiana x sanderae* as well as *N. tabacum* cultivars: ‘Polalta’ and ‘Wiktoria’ with the TSWV resistance gene introduced from *N. alata*, displayed the hypersensitive reaction (HR) against TSWV (grade 0 on symptom intensity scale). In some of those accessions, the virus spread from the initially infected areas eliciting systemic hypersensitive reaction (SHR). Five accessions of *N. alata* and three of *Nicotianaxsanderiae* were composed of 6.3–50.0 % of plants in which SHR symptoms appeared. In all of *N. forgetiana* plants HR reaction was followed by systemic infection (SHR). In *N. tabacum* ‘Wiktoria’ 21.1 % of plants showed HR reaction, while the

remaining were susceptible (S). All of the genotypes which responded with HR or SHR reaction to TSWV infection demonstrated the presence of SCAR markers linked to the resistance gene. The remaining eighty tested accessions were identified as being susceptible upon exposure to TSWV.

**Keywords** Germplasm · Hypersensitive reaction (HR) · *Nicotiana* spp. · Resistance · SCAR markers · *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)

## Introduction

The genus *Nicotiana* is one of the most numerous in the family *Solanaceae*. *Nicotiana* species are native to North and South America, Australia, some Pacific islands and Namibia in Africa. Such an extensive area of origin and evolutionary heterogeneity makes *Nicotiana* an extremely diversified group. This diversity manifests itself with variation in chromosome number, multiplicity of morphological forms, different responses to day length, presence of different alkaloids, varied resistance responses to pests and diseases (Doroszevska et al. 2009).

For many years, the most popular systematics of the genus was that by Kostoff (1943) and Goodspeed (1954) with subsequent additions made by Burbidge (1960). Recently, a revised systematics based on molecular research was proposed (Chase et al. 2003; Clarkson et al. 2004; Knapp et al. 2004). In the new

---

D. Laskowska (✉) · T. Doroszevska ·  
A. Depta · K. Kursa · H. Olszak-Przybyś · A. Czubacka  
Department of Plant Breeding and Biotechnology,  
Institute of Soil Science and Plant Cultivation—State  
Research Institute, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy,  
Poland  
e-mail: dlaskowska@iung.pulawy.pl

classification by Knapp et al. (2004) subgenera were dropped and only the division into sections was retained. According to the new classification, *N. trigonophylla* Dun. was renamed *N. obtusifolia* Martens et Galeotti, *N. affinis* Hort is synonymous with *N. alata* Link et Otto, and *N. bigelovii* (Torrey) Watson with *N. quadrivalvis* Pursh. *N. sanderae* Hort. is currently regarded to be hybrid between *N. alata* and *N. forgetiana* Hemsl. (*Nicotiana x sanderae*) whereas *N. eastii* Kostoff is an autotetraploid variant of *N. suaveolens* Lehm. (Chase et al. 2003; Knapp et al. 2004).

The tobacco collection maintained in the Institute of Soil Science and Plant Cultivation in Puławy, Poland, consists of 1027 accessions belonging to 64 species of the genus *Nicotiana*, including 784 botanical varieties and cultivars of *N. tabacum* and 95 forms of *N. rustica*. Collection accessions are examined for various traits but one of the most important items in the evaluation of *Nicotiana* germplasm is screening for resistance to diseases (Doroszevska and Przybyś 2007; Doroszevska and Depta 2011).

*Tomato spotted wilt virus* (TSWV) is an economically important pathogen which has been reported worldwide in 1,090 different host species belonging to 85 botanical families, involving such important crops as potatoes, tomatoes, tobacco, pepper, lettuce, papaya, celery, eggplant (Parella et al. 2003). In tobacco, symptoms of TSWV include chlorosis and necrosis of the leaves and stems. Oftentimes, the systemic infection is unilateral. Apical buds frequently twist and bend to about 45°. The infection may ultimately lead to stunting and death of the plants (Mumford et al. 1996).

*Tomato spotted wilt virus* is the member of the genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae* (Francki et al. 1991; Wijkamp et al. 1993), and is transmitted in nature by at least eight species of thrips (*Thripidae: Thysanoptera*) (Jones 2005). The occurrence of many weed hosts that harbour the pathogen and the transmission by thrips make it difficult to control the virus, therefore screening of *Nicotiana* accessions for TSWV and introgression of the resistance into commercial tobacco cultivars would be the most effective way to minimize the damage by this disease. Although resistant lines have been developed in tobacco by transforming plants with the TSWV nucleocapsid gene (Herrero et al. 2000), they are not acceptable to the tobacco market.

Genetic resistance to TSWV is scarce in cultivated host species. A few sources of resistance have been identified and incorporated into commercial cultivars of tomato and pepper. *Sw-5* gene from *Solanum peruvianum* L. has been broadly utilized in tomato breeding (Stevens et al. 1992). Additionally, *Sw-6* gene was found in *S. peruvianum* and introgressed to *S. lycopersicum* L. 'UPV-1' line (Rosello et al. 2001). *Sw-7* gene from *S. chilense* (Dun.) Reiche 'LA 1938' was transferred to *S. lycopersicum* 'Y118' (Canady et al. 2001). In *Capsicum chinense* Jacq. and *C. annum* L. the only locus to bring on TSWV resistance was named *Tsw* (Black et al. 1991; Boiteux 1995; Roggero et al. 1999).

Of the wild *Nicotiana* species, the following were the most frequently reported as potential sources for TSWV resistance: *N. alata* Link et Otto (Opoka 1969; Gajos 1978; Ivancheva-Gabrovska 1978; Jankowski 1980; Kovalenko et al. 1987; Palakarcheva and Yancheva 1989), *N. sanderae* Hort. (Ivancheva-Gabrovska 1978; Jankowski 1980; Kovalenko et al. 1987; Palakarcheva and Yancheva 1989; Shcherbatenko and Oleshchenko 2006), *N. glauca* Graham (Opoka 1969; Ivancheva-Gabrovska 1978; Pop 1979; Kovalenko et al. 1987; Shcherbatenko and Oleshchenko 2006), *N. langsdorfii* Weinm. (Gajos 1978; Pop 1979; Kovalenko et al. 1987; Palakarcheva and Yancheva 1989), *N. longiflora* Cav. (Pop 1979; Jankowski 1980), *N. trigonophylla* Dun. (Jankowski 1980; Kovalenko et al. 1987), *N. forgetiana* Hemsl. (Ivancheva-Gabrovska 1978), *N. fragrans* Hook. (Jankowski 1980), *N. noctiflora* Hook. (Opoka 1969), *N. palmeri* Gray (Kovalenko et al. 1987).

The latest host-lists of TSWV (Cho et al. 1987; Edwardson and Christie 1997; Gognalos et al. 1999; Parella et al. 2003; Scott 2012) contradict much of those earlier reports on TSWV resistance. They contain as many as 61 susceptible *Nicotiana* species, including all of the mentioned above, except *N. forgetiana*.

There are no commercially exploited TSWV-resistant tobacco cultivars either in Poland or elsewhere in the world. Some of the *Nicotiana* wild species cited above as resistant were tried as sources of resistance to TSWV in tobacco breeding. Transfer of the resistance from *N. alata* was tried by the conventional breeding method (Stoyanova 1979; Gajos 1981, 1988, 1993; Ivancheva-Gabrovska and Manolov 1982; Berbeć 1987) as well as using in vitro culture techniques

(Dorossiev et al. 1978; Patrascu and Paunescu 1997; Laskowska and Berbec 2005; Shcherbatenko and Oleshchenko 2006) and by somatic hybridization (Nagao 1982; Flick and Evans 1983; Dimanov and Atanassov 1989). The cross-breeding between *Nicotiana x sanderae* and cultivated tobacco was conducted by Skucińska et al. (1977), Ivancheva-Gabrovska and Manolov (1982), Palakarcheva and Yancheva (1985), Dorossiev and Palakarcheva (1990), Kovalenko et al. (1989), Shcherbatenko and Oleshchenko (2006). Occasionally, the potentials of *N. glauca* and *N. noctiflora* as germplasm sources for TSWV resistance were also studied (Kovalenko et al. 1989; Dorossiev and Palakarcheva 1990; Shcherbatenko and Oleshchenko 2006).

In spite of the efforts made by numerous breeders, up to now only two tobacco (*N. tabacum* L.) cultivars, both released in Poland—‘Polalta’ and ‘Wiktorija’—carry a confirmed TSWV resistance response of the hypersensitive type from *N. alata* (Gajos 1988, 1993; Yancheva 1990; Moon and Nicholson 2007). The gene transfer mechanism leading to the development of ‘Polalta’ lacks adequate documentation, but *N. otophora* seems to be involved as a bridging species in the transfer (Gajos 1981). Further multiple crossing of the interspecies hybrid (*N. tabacum* × *N. alata*) with Virginia cultivars has resulted in developing the cultivar ‘Wiktorija’ (Gajos 1993). However, when those resistant cultivars are crossed with other *N. tabacum* genotypes morphological deformations such as thickened and ribbon-shaped leaves, irregular venation, or tumours appear in the resulting progeny and successive segregating generations (Kennedy and Nielsen 1993, Moon and Nicholson 2007). ‘Polalta’ and ‘Wiktorija’ are not grown commercially because of poor agronomic performance caused by the introgressed DNA from *N. alata* or *N. otophora* (Kennedy and Nielsen 1993; Moon and Nicholson 2007). AFLP and SCAR markers linked with the *N. alata* DNA segment conferring resistance to TSWV were identified by Moon and Nicholson (2007) in *N. tabacum* ‘Polalta’. The molecular sequence of the gene encoding TSWV resistance in that segment has not yet been established.

Because of the poor breeding progress, the contradictory data available in the literature and the necessity to diversify available sources of resistance, there is a continued need to search for possible new resistant accessions. Our objective was to re-examine the reaction of *Nicotiana* germplasm accessions

mechanically inoculated with TSWV in combination with the use of SCAR markers (Moon and Nicholson 2007) to detect the presence of the DNA segment bearing the TSWV resistance-conferring gene.

## Materials and methods

### Plant materials

Ninety-four entries, belonging to 62 species of the genus *Nicotiana*, including seven botanical varieties and two cultivars of *N. tabacum*, twelve varieties of *N. rustica*, five of *N. quadrivalvis*, seven populations of *N. alata* of diverse origin, and four of *Nicotiana x sanderae* (Table 1), were used in this study. All of them came from the collection of the Institute of Soil Science and Plant Cultivation—State Research Institute in Puławy, Poland.

Species and section names were given according to the current classification by Knapp et al. (2004).

### Resistance tests

The TSWV isolate used for inoculation tests was collected from one plant that showed typical systemic symptoms of TSWV infection on a tobacco plantation in Łąkoć, Lublin district, eastern Poland. The isolate was multiplied on the *N. tabacum* ‘Samsun’ plants, resistant to *Tobacco mosaic virus*, according to the method given below. In order to avoid possible changes in the inoculum after repeated mechanical inoculations, the isolate was multiplied only three times. Serological methods were used to confirm that the TSWV isolate was free from the contamination with common tobacco viruses (*Potato virus Y*, *Tobacco mosaic virus*). Infected plant tissues from ‘Samsun’ leaves prepared in 2009 were deep-frozen (−80 °C) and thawed prior to resistance tests. Inoculum was prepared as follows: thawed tissues were ground in phosphate buffer (9.078 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 11.867 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) with the addition of 0.5 % mercapthoethanol and 1 % carborundum (400 mesh) (Tsakiridis and Gooding 1972). The proportion was 1 g tissue to 2 ml of buffer.

The isolates were multiplied, collection accessions were grown, and resistance tests were conducted in a cabinet in constant conditions of 25 °C under a 15/9 h light/dark cycle at a light intensity of 12,000 Lux.

**Table 1** Evaluation of *Nicotiana* germplasm accessions to mechanical TSWV infection

Species	Symptoms	ELISA positive plants/total tested plants	Symptom severity index
Section: <i>Alatae</i>			
<i>N. alata</i> var. <i>alba</i> (from Oslo)	HR/SHR	03/10	0/3
<i>N. alata</i> (from Oslo)	HR	00/15	0
<i>N. alata</i> (from Warsaw)	HR	00/16	0
<i>N. alata</i> var. <i>grandiflora</i> (from Vilnius)	HR/SHR	08/16	0/2
<i>N. alata</i> var. <i>grandiflora</i> (from Bergerac)	HR/SHR	05/16	0/2
<i>N. alata</i> (from Scafati)	HR/SHR	03/15	0/2
<i>N. alata</i> 'Biały Narcyz' (breeding in Warsaw)	HR/SHR	01/16	0/3
<i>N. forgetiana</i>	SHR	10/10	3
<i>N. langsdorfii</i>	S	06/06	3
<i>N. longiflora</i>	S	06/06	2
<i>N. plumbaginifolia</i>	S	06/06	3
<i>Nicotiana x sanderae</i> (from Warsaw) <sup>a</sup>	HR/SHR	06/12	0/2
<i>Nicotiana x sanderae</i> —lilac (from Oslo)	HR/SHR	04/12	0/1
<i>Nicotiana x sanderae</i> —white (from Oslo)	HR	00/11	0
<i>Nicotiana x sanderae</i> —red (from Oslo)	HR/SHR	02/12	0/2
Section: <i>Nicotiana</i>			
<i>N. tabacum</i> var. <i>atropurpurea grandiflora</i>	S	06/06	2
<i>N. tabacum</i> var. <i>auriculata</i>	S	06/06	2
<i>N. tabacum</i> var. <i>fruticosa</i>	S	06/06	2
<i>N. tabacum</i> var. <i>gigantea</i>	S	06/06	2
<i>N. tabacum</i> var. <i>havanensis</i>	S	06/06	2
<i>N. tabacum</i> var. <i>petiolaris</i>	S	06/06	2
<i>N. tabacum</i> var. <i>macrophylla purpurea</i>	S	06/06	2
<i>N. tabacum</i> 'Polalta'	HR	00/16	0
<i>N. tabacum</i> 'Wiktoria'	HR/S	15/19	0/3
Section: <i>Noctiflorae</i>			
<i>N. glauca</i>	S	06/06	2
<i>N. noctiflora</i>	S	06/06	3
<i>N. petunioides</i>	S	06/06	1
Section: <i>Paniculatae</i>			
<i>N. benavidesii</i>	S	06/06	1
<i>N. cordifolia</i>	S	06/06	3
<i>N. knightiana</i>	S	06/06	2
<i>N. paniculata</i>	S	06/06	2
<i>N. raimondii</i>	S	06/06	3
<i>N. solanifolia</i>	S	06/06	3
Section: <i>Petunioides</i>			
<i>N. acuminata</i>	S	06/06	3
<i>N. attenuata</i>	S	06/06	3
<i>N. corymbosa</i>	S	06/06	3
<i>N. linearis</i>	S	06/06	2
<i>N. miersii</i>	S	06/06	2

**Table 1** continued

Species	Symptoms	ELISA positive plants/total tested plants	Symptom severity index
<i>N. pauciflora</i>	S	06/06	3
Section: <i>Polydicliae</i>			
<i>N. quadrivalvis</i> var. <i>bigelovii</i>	S	06/06	2
<i>N. quadrivalvis</i> var. <i>quadrivalvis</i>	S	06/06	2
<i>N. quadrivalvis</i> var. <i>multivalvis</i>	S	06/06	3
<i>N. quadrivalvis</i> var. <i>wallacei</i>	S	06/06	2
<i>N. quadrivalvis</i>	S	06/06	2
Section: <i>Repandae</i>			
<i>N. nesophila</i>	S	06/06	3
<i>N. nudicaulis</i>	S	06/06	3
<i>N. repanda</i>	S	06/06	2
<i>N. stoctonii</i>	S	06/06	2
Section: <i>Rusticae</i>			
<i>N. rustica</i> var. <i>argentea</i>	S	06/06	2
<i>N. rustica</i> var. <i>brasilia</i>	S	06/06	2
<i>N. rustica</i> var. <i>cerinthoides</i>	S	06/06	2
<i>N. rustica</i> var. <i>chlorotica</i>	S	06/06	2
<i>N. rustica</i> var. <i>eischfeldii</i>	S	06/06	2
<i>N. rustica</i> var. <i>humilis</i>	S	06/06	2
<i>N. rustica</i> var. <i>neuchestii</i>	S	06/06	2
<i>N. rustica</i> var. <i>ovata</i>	S	06/06	2
<i>N. rustica</i> var. <i>oviformis</i>	S	06/06	2
<i>N. rustica</i> var. <i>pavonii</i>	S	06/06	2
<i>N. rustica</i> var. <i>pumila</i>	S	06/06	2
<i>N. rustica</i> var. <i>texana</i>	S	06/06	2
Section: <i>Suaveolentes</i>			
<i>N. africana</i>	S	06/06	2
<i>N. amplexicaulis</i>	S	06/06	2
<i>N. benthamiana</i>	S	06/06	2
<i>N. cavicola</i>	S	06/06	2
<i>N. debney</i>	S	06/06	3
<i>N. eastii</i> <sup>a</sup>	S	06/06	2
<i>N. excelsior</i>	S	06/06	3
<i>N. exigua</i>	S	06/06	3
<i>N. goodspeedii</i>	S	06/06	2
<i>N. gossei</i>	S	06/06	2
<i>N. hesperis</i>	S	06/06	3
<i>N. ingulba</i>	S	06/06	3
<i>N. maritima</i>	S	06/06	2
<i>N. megalosiphon</i>	S	06/06	2
<i>N. occidentalis</i>	S	06/06	3
<i>N. rosulata</i>	S	06/06	3
<i>N. rotundifolia</i>	S	06/06	3



**Table 1** continued

Species	Symptoms	ELISA positive plants/total tested plants	Symptom severity index
<i>N. simulans</i>	S	06/06	2
<i>N. suaveolens</i>	S	06/06	2
<i>N. umbratica</i>	S	06/06	2
<i>N. velutina</i>	S	06/06	1
<i>N. wuttkei</i>	S	06/06	2
Section: <i>Sylvestres</i>			
<i>N. sylvestris</i>	S	06/06	3
Section: <i>Tomentosae</i>			
<i>N. kawakamii</i>	S	06/06	2
<i>N. otophora</i>	S	06/06	1
<i>N. setchelli</i>	S	06/06	1
<i>N. tomentosiformis</i>	S	06/06	2
Section: <i>Trigonophyllae</i>			
<i>N. obtusifolia</i>	S	06/06	1
<i>N. palmeri</i>	S	06/06	1
Section: <i>Undulatae</i>			
<i>N. arentsii</i>	S	06/06	1
<i>N. glutinosa</i>	S	06/06	3
<i>N. thyrsiflora</i>	S	06/06	3
<i>N. undulata</i>	S	06/06	2
<i>N. wigandioides</i>	S	06/06	1

The origin of *Alatae* section accessions, given in brackets, mean: from Oslo—included to the Pulawy collection in 1948 from Oslo Botanical Garden; from Warsaw—included from Warsaw Botanical Garden in 1969; breeding in Warsaw—breeding in unknown institution of Warsaw, acquired in 1956; from Vilnius—comes from unknown Vilnius institution, 1935; from Bergerac—acquired from The Tobacco Institute of Bergerac, France, 1938; from Scafati—from Scafati Tobacco Institute, Italy, 1968

<sup>a</sup> According to Knapp et al. (2004) classification was not given the status of separate species

Plants were germinated in a sterilized peat soil mixture in small pots (7.0 cm × 6.0 cm × 6.0 cm). One-week-old seedlings were transplanted to 160 plastic cell trays, ten cells for each accession. Four to eight weeks after sowing, when the seedlings developed at least three pairs of true leaves, they were individually planted to pots of 16 cm in diameter, containing steamed soil.

Resistance tests were conducted in 2010 and 2011. About 200 plants were inoculated in one series. Eight plants were prepared per accession, from which two plants were used as the blank controls. In each resistance test, eight plants of standard control cultivars: susceptible ‘Wiślica’ and resistant ‘Polalta’ were included. In *N. alata*, *N. sanderae*, *N. forgetiana*, *N.*

*tabacum* ‘Polalta’ and *N. tabacum* ‘Wiktoria’ accessions, six to fifteen plants were additionally tested, depending on availability of seeds.

Virus was transmitted to six-leaved plants using mechanical inoculation. Blank controls were inoculated only with phosphate buffer and carborundum. These controls were used as negatives for the ELISA test. Plants were monitored for the progress of disease symptoms 5, 7, 14, 21 and 35 days after inoculation. The symptoms were determined as: HR—hypersensitive reaction—score 0 on the symptoms intensity scale, SHR—systemic hypersensitive reaction, S—susceptible. The intensity of the symptoms in plants which developed systemic infection was scored on the following scale: 1—chlorotic spots, vein clearing, 2—

necrotic spots, stem and leaves necrosis, curving of the apex, flower deformation, wrinkled upper leaves, 3— inhibited growth, plants die out. TSWV infection was confirmed by a standard DAS-ELISA as described by Clark and Adams (1977), using a commercial polyclonal antiserum against TSWV proteins (Bioreba AG, Switzerland). Absorbance after serological reaction was measured at the optical density of 405 nm with a Tecan microplate reader. Samples were taken from the top leaves of each plant. In all *N. alata*, *N. sanderae*, *N. forgetiana*, *N. tabacum* ‘Polalta’ and *N. tabacum* ‘Wiktorja’ plants, samples were taken from two stalk positions—top leaves (without or with symptoms) and bottom leaves with necrotic local lesions. All leaf samplings for ELISA tests were taken 1 week after development of the TSWV symptoms. Plants were considered as susceptible when samples thereof showed an absorbance value of at least twice that of the absorbance reading in the negative controls.

#### Detection of markers linked to TSWV resistance

Detections of markers were preceded by isolation of DNA carried out according to the methodology described by Czubačka and Doroszevska (2010). DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR). Four AFLP markers: AAC/CCC172, ACT/CTA169, AAG/CGA228, ACT/CTA268, previously determined to be closely associated in coupling with the TSWV resistance gene present in cultivar Polalta (Moon and Nicholson 2007) were used in this study. Those markers use pairs of SCAR primers: AGCTTC TTTTCTCTTTCCATTTTT and CAGAAGAAAA CTGCTGGAGCTAT, ACTTTTCACACCAAAAAC TCACG and GTAGATGATAAAGATTGAAGAAA ACAA, TAGATGTCATGAATGGAACACTACGG and TTTTGATCGAAAAACCCAACC, CTGATCGTT CCAGCAGGTTCTTAT and GGAGCTATTTCCA GACACGAA, respectively. The size of the PCR-amplified products of the first three markers were 117, 105 and 117 bp. The ATC/CTA268 marker generates two PCR-amplified products (161 and 200 bp) in genotypes carrying the TSWV resistance gene and one product (200 bp) in genotypes that do not possess that gene. The amount of 1 µl plant DNA (approximately 20 ng/µl) was added to the mixture containing 1.9 units of Taq polymerase (Fermentas) and 4.5 pmol of each primer per 20 µl reaction, 1.5 × PCR buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 312.5 µM dNTPs. The PCR was done

in a thermocycler using the following amplification procedure: for 2 min at 94 °C followed by 30 cycles: 30 s at 94 °C, 30 s at 53.5, 50, 53.5 and 55 °C for individual markers, 40 s at 72 °C and a final elongation step 5 min at 72 °C. The products of PCR were analysed by electrophoresis in 2 % agarose gels in 1 × TBE buffer (100 mM Tris, 90 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA, pH 8.5) at 7–10 V/cm.

PCR analysis was done on all TSWV tested plants of *N. alata*, *N. forgetiana*, *Nicotiana x sanderae*, *N. langsdorfii*, *N. longiflora*, *N. plumbaginifolia*, *N. tabacum* ‘Polalta’, *N. tabacum* ‘Wiktorja’ and on susceptible plants of *N. tabacum* ‘Wiślica’ as a control.

## Results

The symptoms of TSWV varied greatly depending on the species involved. *N. alata*, *Nicotiana x sanderae*, *N. forgetiana*, *N. tabacum* ‘Polalta’ and some plants of *N. tabacum* ‘Wiktorja’ showed the typical hypersensitive reaction (HR). In those accessions local yellow discolorations which evolved into concentric necrotic local spots appeared in 5–7 days after inoculation. In *N. alata*, *Nicotiana x sanderae* and *N. forgetiana* necrotic spots were 6–7 mm in diameter and in ‘Polalta’ and ‘Wiktorja’—2–3 mm. In some plants of those accessions local lesions were subsequently accompanied by chlorotic spots, and in 14 days the systemic infection set in, at first manifested as fast-growing and coalescing chlorotic necrotic spots, which ultimately led to leaf and apex distortion (systemic hypersensitive reaction—SHR) (Table 1).

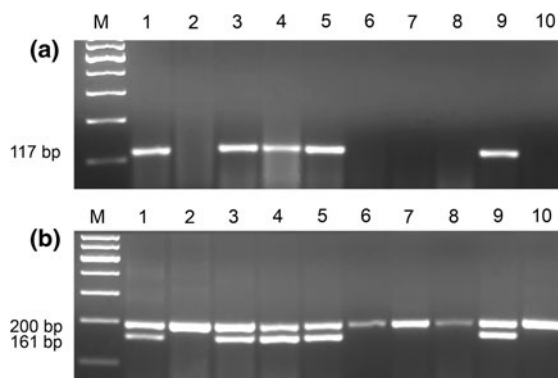
In plants with HR reaction TSWV was detected only in the inoculated leaves that showed localized concentric lesions but not in the newly developed, non-inoculated leaves. No systemic symptoms developed in these plants within 5 weeks after inoculation. Two of the seven *N. alata* populations, one of the four *Nicotiana x sanderae* as well as *N. tabacum* ‘Polalta’ were found to be composed entirely of plants that showed HR response. In the remaining *N. alata* and *Nicotiana x sanderae* accessions listed in the Table 1, plants with SHR symptoms appeared. In those plants, TSWV spread out of the necrotic lesions into the inoculated leaves and was able to bring about systemic infection. SHR plants accounted for 6.3–50.0 % of *N. alata* populations under study and from 16.7 to 50.0 % of *Nicotiana x sanderae*. Four out of 19 ‘Wiktorja’

plants screened for the reaction to TSWV showed HR response, the remaining were susceptible (S). In *N. forgetiana* TSWV induced a hypersensitive response, shown by the appearance of necrotic local lesions 5 days post inoculation, but severe systemic symptoms developed in all of the tested plants within the next 10 days (SHR reaction). Virus accumulation in the newly developed, non-inoculated leaves of all of the SHR plants showed ELISA absorbance values within a range of 0.369–2.747.

In the remaining entries listed in Table 1, typical systemic symptoms (S) of the TSWV infection were observed with varying intensity. In *N. petunioides*, *N. benavidesii*, *N. velutina*, *N. otophora*, *N. setchelli*, *N. obtusifolia*, *N. palmeri*, *N. arentsii*, *N. wigandioides*, vein clearing as well as individual chlorotic spots were observed, without necrotic symptoms. Frequently unilateral vein clearing occurred, involving only one half of the leaf (a score of 1 on the symptoms scale). DAS-ELISA absorbance values in the non-inoculated leaves (from 0.490 to 2.890) confirm their susceptibility. The remaining 71 accessions listed in Table 1 developed more severe symptoms. In the typical course of the disease, chlorotic and necrotic rings and irregular spots on the inoculated leaves appeared seven days after infection and grew into large chlorotic and necrotic areas. During the next 14 days the infection symptoms, including vein clearing, leaf distortions, and the characteristic curving of the apex, spread to the upper portion of the plant. This systemic infection was often unilateral (score of 2 on the symptom intensity scale). Stunting and death, (score

of 3) followed in some of those accessions. The content of TSWV in the upper leaves of the accessions with scores of 2 or 3, resulted in DAS-ELISA absorbance values from 0.299 to 3.194 and was not correlated with symptoms manifested by the plants.

Plants of *N. alata*, *N. forgetiana*, *Nicotiana x sanderae* and *N. tabacum* ‘Polalta’ responded to all four TSWV resistance-linked markers (Table 2; Fig. 1). Of the 19 *N. tabacum* ‘Wiktoria’ tested plants, four (21.1 %) which showed HR reaction to TSWV responded to all four markers and the others failed to show response to any. The remaining entries listen in



**Fig. 1** Amplification profiles generated by SCAR markers S-AAC/CCC172 (a) and S-ACT/CTA268 (b), linked with TSWV resistance gene. Lane M 100 bp DNA ladder, lane 1 *N. tabacum* ‘Polalta’, lane 2 susceptible control *N. tabacum* ‘Wiślica’, lanes 3–10 *N. alata*, *N. forgetiana*, *Nicotiana x sanderae*, *N. langsдорфii*, *N. longiflora*, *N. plumbaginifolia*, *N. tabacum* ‘Wiktoria’ resistant individual, *N. tabacum* ‘Wiktoria’ susceptible individual

**Table 2** Response to SCAR markers (Moon and Nicholson 2007) linked to TSWV resistance in some species of the section *Alatae*, *N. tabacum* cultivars with the resistance introduced from *N. alata* and *N. tabacum* ‘Wiślica’ as a negative control

Genotype	Markers			
	AAC/CCC172	ACT/CTA268	ACG/CCG169	AAG/CGA228
<i>N. tabacum</i> ‘Polalta’	+	+	+	+
<i>N. tabacum</i> ‘Wiślica’	–	–	–	–
<i>N. alata</i>	+	+	+	+
<i>N. forgetiana</i>	+	+	+	+
<i>Nicotiana x sanderae</i>	+	+	+	+
<i>N. langsдорфii</i>	–	–	–	–
<i>N. longiflora</i>	–	–	–	–
<i>N. plumbaginifolia</i>	–	–	–	–
<i>N. tabacum</i> ‘Wiktoria’ <sup>a</sup>	±	±	±	±

<sup>a</sup> Four out of 19 ‘Wiktoria’ plants responded to all four SCAR markers

Table 2 did not respond to any of the markers. All plants of the genotypes which showed the HR or SHR reactions responded to TSWV resistance-linked molecular markers.

## Discussion

In this study, only the members of the section *Alatae*: *N. alata*, *N. forgetiana*, and *Nicotiana x sanderae* as well as cultivars of *N. tabacum*: ‘Polalta’ and ‘Wiktoria’, with the resistance gene introduced from *N. alata* (Gajos 1988, 1993; Yancheva 1990; Moon and Nicholson 2007) showed localized induced cell death at the site of TSWV infection.

The resistance to TSWV is in various plant species associated with a hypersensitivity response (HR). This type of reaction was detected in tomato (*Solanum lycopersicum* L. ‘Steven’) carried by the *Sw-5* gene of resistance (Stevens et al. 1992) as well as in peanut (*Arachis hypogaea* L.), cultivar ‘C11-2-39’ (Mandal et al. 2002). The same symptoms followed by abscising of cotyledons and leaves developed on resistant plants of *Capsicum chinense* Jacq. and *C. annum* L. (‘PI 152225’ and ‘PI 159236’) which carried the *Tsw* gene (Black et al. 1991).

A hypersensitive response (HR) is defined as rapid death of plant cells at the site of pathogen ingress in association with the restraint on pathogen growth, which confines the pathogen to the initial infection area (Goodman and Novacky 1994). This kind of “gene-for-gene” resistance in plants, in which resistant host and the avirulent pathogen are incompatible, is termed as *R-Avr*-mediated defense response (Flor 1971). The arrest of an avirulent virus is associated with induction of a variety of defense-related genes including pathogenesis-related (PR) proteins and a wide range of physiological changes (Hammond-Kosack and Jones 1996).

Some *N. alata* and *Nicotiana x sanderae* populations investigated in this study were composed entirely of HR plants whereas some other segregated for the HR and SHR plants, in which virus-induced HR was followed by SHR. In *N. forgetiana* all plants developed SHR. This could be the reason for some discrepancies in the literature regarding the resistance of these species and their suitability as potential sources of resistance to TSWV in tobacco improvement (Ivancheva-Gabrovska 1978; Jankowski 1980; Kovalenko

et al. 1987; Palakarcheva and Yancheva 1989) or susceptibility (Opoka 1969; Ruter and Gitaitis 1993). Elicitation of SHR, instead of localized HR, is quite frequent in the interactions involving avirulent viruses and resistant plants. Similar to our findings, Mandal et al. (2002) observed, that in 17.6–46.7 % plants of the peanut ‘C11-2-39’ initial HR was followed by systemic infection. In *Solanum lycopersicum* up to 8.0 % of plants were found to be infected with TSWV (Stevens et al. 1992; Rosello et al. 1998). Also in *Capsicum* a small but significant proportion of plants in resistant ‘PI 152225’ and ‘PI 159236’ lines showed systemic TSWV infection (Soler et al. 1999).

Currently, the underlying molecular and biochemical mechanisms leading to SHR are not understood (Hajimorad et al. 2005). Dinesh-Kumar et al. (2000) have postulated that SHR is a consequence of delayed occurrence of biochemical and physiological events that are associated with localized HR. They found, that the HR induced by TMV in a tobacco plant which carried an in vitro-constructed variant of *N*-resistance gene, occasionally spread to the entire plant, resulting in SHR. The authors suggest that some loss-of-function *N* alleles such as the TIR (Toll/interleukin-1 receptor homology region) deletion and the point mutation in the NBS (nucleotide-binding site) may cause a systemic hypersensitive response (SHR).

The mechanism of the HR reaction is strongly influenced by such conditions as high temperatures or the development stage of the plants at virus inoculation (Roggero et al. 1996; Moury et al. 1997; Soler et al. 1998; Mandal et al. 2002). The resistance could be also lost by a mutation in the corresponding pathogen *Avr* gene (Ellis et al. 2000). In our study, ambient conditions, plant development stage at inoculation, and the isolate used were constant, so that there is some chance that this resistance response was genotype-dependent.

One of such factors that can result in virus escape to distant tissues, provoking SHR in resistant genotypes could be heterozygosity rather than homozygosity of the *R*-genotype plant (Moury et al. 1998; Chen et al. 1994). In *N. alata* and *Nicotiana x sanderae* the self-incompatibility and large polymorphism of the entries may be the reason of the incomplete homozygosity and segregation of the resistance trait. Small outcrossing populations such as those maintained in germplasm collections are particularly prone to genetic drift and consequent changes in allele frequencies. Gajos

(1981) and Yancheva (1990) report for *N. tabacum* ‘Polalta’ that heterozygous generations were resistant, but when resistant ‘Polalta’ × ‘Wiślica’ DH breeding lines were backcrossed to ‘Wiślica’ (Laskowska and Berbec 2010), in the resulting heterozygous hybrid populations the proportion of resistant to susceptible plants differed slightly from the expected ratios in favor of susceptible plants.

The observed ratio of resistant to susceptible haploid plants obtained through androgenesis from the F<sub>1</sub> ‘Polalta’ with susceptible ‘Wiślica’ hybrid was skewed, resulting in an excess of susceptible genotypes (Laskowska and Berbec 2010). The changes in the genetic background of an R gene-carrying plant can influence the HR reaction (Hajimorad et al. 2005; Lanfermeijer et al. 2005), which fits with the results presented here. The resistance in different populations of *N. alata* ranged from 50 to 100 %. The resistance factor transferred from *N. alata* into *N. tabacum* gave a good protection against TSWV when employed in the genetic milieu of ‘Polalta’ (100.0 % of resistant plants) and was poorly expressed and erratic in ‘Wiktorija’ (21.1 % of resistant plants).

‘Polalta’ is recognized as the best source of resistance to TSWV in tobacco. The cultivar is used in tobacco breeding and as the resistance check in testing for resistance (Herrero et al. 2000; Moon and Nicholson 2007; Laskowska and Berbec 2010). Gajos (1981) formulated a hypothesis of monogenic dominant resistance to TSWV introgressed from *N. alata* to the *N. tabacum* ‘Polalta’. This model of inheritance was confirmed by Yancheva (1990) and Moon and Nicholson (2007). Likewise TSWV resistance in breeding lines of tobacco obtained from ‘Polalta’ by Laskowska and Berbec (2010) depended on one dominant gene. The presence of minor resistance-modifying genes cannot be entirely excluded as a factor affecting the expression of resistance. Kennedy and Nielsen (1993) investigated F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> and backcross generations and assumed ‘Polalta’ to possess digenic resistance. According to Fraser (1990) virus localization is a phenomenon associated with resistance alleles which are phenotypically dominant and are usually controlled by one or a few major genes. The genes controlling resistance to TSWV in tomato (*Sw-5*) and pepper (*Tsw*) are inherited as a single dominant character (Stevens et al. 1992; Boiteux and de Avila 1994).

The molecular analysis with the use of SCAR markers described by Moon and Nicholson (2007) as

tightly linked to TSWV resistance gene, confirmed its presence in all tested plants of both HR and SHR genotypes shown in Table 2. The lack of the HR/SHR responses and the absence of reaction to resistance-linked molecular markers in some ‘Wiktorija’ plants suggest the loss of resistance gene rather than changes to the gene’s molecular structure. In Poland, the resistance conferred by the R gene in ‘Wiktorija’ was overcome by TSWV soon after it was introgressed into that cultivar. In the study of Moon and Nicholson (2007) the plants of ‘Wiktorija’ responded to 17 markers linked to the resistance gene.

This is the first report which provides the reaction of *N. forgetiana* to the resistance-linked molecular markers described by Moon and Nicholson (2007). The species, closely related to *N. alata* (Clarkson et al. 2004) was found completely susceptible (SHR) to TSWV. Minor differences in genomic sequences at the amino acid level, related to resistance responses, may exist between these two species.

The hypersensitive reaction (HR) is the only mechanism responsible for resistance to TSWV known in *Nicotiana*. In natural conditions it seems to be confined to only one species—*N. alata* section *Alatae*, if we take into account *Nicotiana x sanderae*’s origin as artificial hybrid species of *N. alata* × *N. forgetiana*. The majority of wild *Nicotiana* accessions showed systemic symptoms following mechanical inoculation with TSWV.

Most of the *Nicotiana* species named in early reports as potential sources for TSWV resistance, including *N. glauca*, *N. langsdorfii*, *N. longiflora*, *N. trigonophylla* (syn. *N. obtusifolia*), *N. noctiflora*, *N. palmeri*, turned out to be susceptible in our study. One of the reasons for this difference can be that those early investigations (Opoka 1969; Jankowski 1980) relied on natural vector-mediated infection rather than artificial inoculations and their data reflected the feeding preferences of the insect vector rather than intrinsic resistance mechanisms of the host plant. In the other early investigations, in which mechanical inoculation was applied, the reason can be impermanence of the virus which rapidly deactivates once inoculum is prepared and the lack of serological and molecular methods. From the species listed above, *N. trigonophylla* (syn. *N. obtusifolia*), *N. palmeri*, *N. glauca* and *N. noctiflora* are slow-growing perennials and the slow increase of tissue leaves can result in poor symptom development.

In our study most of the species with the lower symptom intensities (score 1): *N. obtusifolia*, *N. palmeri* (*Trigonophyllae*), *N. otophora*, *N. setchelli* (*Tomentosae*), *N. benavidesii* (*Paniculatae*), *N. arenstii*, *N. wigandoides* (*Undulatae*) are slow-growing perennials or woody shrubs, which could affect the symptom development. Only *N. petunioides* (*Noctiflorae*) and *N. velutina* (*Suaveolentes*) are annual herbs.

The group of collection accessions found as susceptible in this study generally agrees with the lists of susceptible hosts reported by other investigators, of which the most extensive is the one compiled by Parella et al. (2003). Among the entries not evaluated in this study but listed by that investigator are: *Nicotiana x calyciflora*, *N. clevelandii*, *N. cycliflora*, *Nicotiana x edwardsonii*, *N. fragrans*, *N. bonariensis*, *N. tomentosa*. Other species listed by Parella et al. (2003)—*N. angustifolia*, *N. caudigera*, *N. macrophylla* and *N. multivalvis*—are synonymous to *N. acuminata*, *N. pauciflora*, *N. tabacum* var. *macrophylla purpurea* and *N. quadrivalvis* var. *multivalvis* of this study. The species *N. wuttkei* was previously evaluated as susceptible by Laskowska and Berbeć (2003).

This study encompassed 12 entries the reaction of which to TSWV had not been reported in literature: *N. africana*, *N. amplexicaulis*, *N. cavicola*, *N. corymbosa*, *N. eastii* (autotetraploid of *N. suaveolens*), *N. gossei*, *N. kawakamii*, *N. otophora*, *N. pauciflora*, *N. setchelli*, *N. simulans*, *N. umbratica* and many botanical varieties within *N. tabacum*, *N. rustica* and *N. quadrivalvis* (Table 1). All those entries were found to be susceptible to TSWV.

In conclusion, it can be stated with a fair degree of probability that the *N. alata*-derived gene which we propose to name *RTSW-al* and which, apart from *N. alata*, gives resistance to TSWV in *Nicotiana x sanderae*, *N. tabacum* ‘Polalta’ and, to a certain degree, in ‘Wiktorija’ is the only source of resistance to TSWV in the genus *Nicotiana*. That source of resistance is difficult to employ in tobacco breeding because of genetic distance between the donors of resistance and the cultivated *N. tabacum*, the expected linkage drag in the hybrids and the unstable expression shown by *RTSW-al* gene. In the future, it will be important to study the molecular structure of the resistance factor in different genotypes of *Nicotiana* as well as to look into the biochemical mechanisms underlying the control of HR/SHR reaction.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

## References

- Berbeć A (1987) Cytogenetical study on *Nicotiana tabacum* L. cv. Nadwiślański Mały (2x and 4x) × *Nicotiana alata* Link et Otto hybrids. *Genetica Pol* 28:251–262
- Black LL, Hobbs HA, Gatti JM (1991) Tomato spotted wilt virus resistance in *Capsicum chinense* PI152225 and 159236. *Plant Dis* 75:863
- Boiteux LS (1995) Allelic relationships between genes for resistance to tomato spotted wilt tospovirus in *Capsicum chinense*. *Theor Appl Genet* 90:146–149
- Boiteux LS, de Avila AC (1994) Inheritance of a resistance specific to tomato spotted wilt tospovirus in *Capsicum chinense* ‘PI-159236’. *Euphytica* 75:139–142
- Burbidge NT (1960) The Australian species of *Nicotiana* L. *Aust J Bot* 8:342–380
- Canady MA, Stevens MR, Barineau MS, Scott JW (2001) Tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in tomato derived from *Lycopersicon chilense* Dun. LA 1938. *Euphytica* 117:19–25
- Chase MW, Knapp S, Cox AV, Clarkson JJ, Butsko Y, Joseph J, Savolainen V, Parokony AS (2003) Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (*Solanaceae*). *Ann Bot* 92(1):107–127
- Chen P, Buss GR, Roane CW, Tolin SA (1994) Inheritance in soybean of resistant and necrotic reaction to soybean mosaic virus strains. *Crop Sci* 34:414–422
- Cho JJ, Mau RFL, Mitchell WC, Gonsalves D, Yudin LS (1987) Host list of plants susceptible to tomato spotted wilt virus (TSWV). *Research Extension Series, Hawaii* 10 pp
- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* 34:475–483
- Clarkson JJ, Knapp S, Garcia VF, Olmstead RG, Leitch AR, Chase MW (2004) Phylogenetic relationships in *Nicotiana* (*Solanaceae*) inferred from multiple plastid DNA regions. *Mol Phylogenet Evol* 33:75–90
- Czubacka A, Doroszewska T (2010) Estimating agronomic traits of transgenic tobacco lines. *Euphytica* 172:35–47
- Dimanov D, Atanassov A (1989) A study of possibility to apply UV light in experiments of somatic hybridization in protoplast cultures of *Nicotiana alata* and *Nicotiana tabacum* (line Virginia 89). *Genet Sel* 22:40–44
- Dinesh-Kumar SP, Tham WH, Baker BJ (2000) Structure–function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14789–14794
- Dorossiev L, Palakarcheva M (1990) Application of in vitro methods in the development of disease resistant tobacco hybrids and lines. *Genet Breed* 23(4):306–315
- Dorossiev L, Palakarcheva M, Stoyanova M (1978) Overcoming the sterility in F<sub>1</sub> of interspecific hybrids of genus *Nicotiana* using the methods of tissue culture. *CORESTA Inf Bull Sofia (Special)*:80–81
- Doroszewska T, Depta A (2011) Resistance of wild *Nicotiana* species to different PVY isolates. *Phytopathologia* 59:9–24

- Doroszewska T, Przybyś M (2007) Charakterystyka odporności gatunków *Nicotiana* na czarną zgniliznę korzeni *Thielaviopsis basicola* (Berk. and Broome) Ferr. [Characterization of *Nicotiana* species resistance to black root rot—*Thielaviopsis basicola* (Berk. and Broome) Ferr.]. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 517:253–266
- Doroszewska T, Depta A, Czubacka A (2009) *Album of Nicotiana species*. Institute of Soil Science and Plant Cultivation National Research Institute, Pulawy
- Edwardson JR, Christie RG (1997) *Viruses infecting peppers and other Solanaceae crops vol 1*. Monograph 18–1. University of Florida Agricultural Experiment Station, Florida
- Ellis J, Dodds P, Pryor T (2000) Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr Opin Plant Biol* 3:278–284
- Flick CE, Evans DA (1983) Isolation, culture and plant regeneration from protoplasts isolated from flower petals of ornamental *Nicotiana* species. *Z Pflanzenphysiol* 109(5):379–383
- Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* 9:275–296
- Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DD, Brown F (1991) Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology Suppl* 2:1–450
- Fraser RSS (1990) The genetics of resistance to plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 28:179–200
- Gajos Z (1978) Podatność dwudziestu dzikich gatunków *Nicotiana* na zakażenie przez wirus brązowej plamistości pomidora (*Lycopersicum virus 3* Smith.) w zależności od wieku roślin inokulowanych [susceptibility of twenty uncultivated species of *Nicotiana* to infection by tomato spotted wilt (*Lycopersicum virus 3*) depending on the age of inoculated plant]. *Biul CLPT* 1–2:25–37
- Gajos Z (1981) Inheritance of resistance to Tomato spotted wilt virus in interspecies hybrids of *Nicotiana tabacum* L. × *Nicotiana alata* Link. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 244:117–126
- Gajos Z (1988) Polalta—odmiana tytoniu odporna na wirus brązowej plamistości pomidora (TSWV) i czarną zgniliznę korzeni (*Thielaviopsis basicola* Ferr.). [Polalta—a tobacco variety resistant to Tomato spotted wilt virus (TSWV) and black root rot (*Thielaviopsis basicola* Ferr.)]. *Biul CLPT* 1–4:7–25
- Gajos Z (1993) Virginia ZG-4 (Wiktorja)—nowa odmiana tytoniu odporna na wirus brązowej plamistości pomidora (TSWV) i czarna zgniliznę korzeni (*Thielaviopsis basicola*). [Virginia ZG-4 (Wiktorja)—a new tobacco variety resistant to tomato spotted wilt virus (TSWV) and black root rot (*Thielaviopsis basicola* Ferr.)]. *Biul CLPT* 1–4:5–19
- Gognalos P, Gebre-Selassie K, Marchoux G (1999) La gamme d'hôtes du TSWV continue à s'étendre. De nouvelles Solanacées sont touchées. *Phytoma* 512:47–50
- Goodman RN, Novacky AJ (1994) The hypersensitive reaction in plants to pathogen. A resistance phenomenon. American Phytopathological Society Press, St. Paul
- Goodspeed TH (1954) The genus *Nicotiana*. *Chronica Botanica*, Waltham
- Hajimorad MR, Eggenberger AL, Hill JH (2005) Loss and gain of elicitor function of soybean mosaic virus G7 provoking Rsv1-mediated lethal systemic hypersensitive response maps to P3. *J Virol* 79:1215–1222
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8:1773–1791
- Herrero S, Culbreath A, Csinos A, Pappu H, Rufty RC, Daub ME (2000) Nucleocapsid gene-mediated transgenic resistance provides protection against tomato spotted wilt virus epidemics in the field. *Phytopathology* 90:139–147
- Ivancheva-Gabrovska T, Manolov A (1982) Investigations of the resistance of interspecific hybrids *Nicotiana tabacum* × *N.alata* and *N.tabacum* × *N.sanderiae* to tomato spotted wilt virus. Reports of second national symposium of plant immunity, *Plovdiv* 2:65–78
- Ivancheva-Gabrovska T (1978) Sources of resistance to tomato spotted wilt virus and *Thrips tabaci* Lind. *Special COR-ESTA Bull, Symposium Sofia*, p 96
- Jankowski F (1980) Źródła odporności na TSWV (*Lycopersicum virus 3*) u dzikich gatunków rodzaju *Nicotiana*. [Sources of resistance to TSWV (*Lycopersicum virus 3*) among uncultivated species of *Nicotiana* genus]. *Biul CLPT* 1–2:3–8
- Jones DR (2005) Plant viruses transmitted by thrips. *Eur J Plant Pathol* 113:119–157
- Kennedy BS, Nielsen MT (1993) Characterization of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in the tobacco cultivar 'Polalta'. (Abstr). *Phytopathology* 83(12):1420
- Knapp S, Chase MW, Clarkson JJ (2004) Nomenclatural changes and a new sectional classification in *Nicotiana* (*Solanaceae*). *Taxon* 53(1):73–82
- Kostoff D (1943) *Cytogenetics of the genus Nicotiana*. State Printing House, Sofia
- Kovalenko AG, Rud EA, Strelyaeva NI, Oleshchenko LT (1987) Responses of tobacco varieties, wild species and interspecies hybrids on artificial infection with tomato spotted wilt virus. *Mikrobiologicheskii Zhurnal* (Kiev) 49:85–89
- Kovalenko AG, Shcherbatenko IS, Oleshchenko LT, Rud EA, Strelyaeva NI (1989) The production of fertile somaclones of interspecific tobacco hybrids with high resistance to tomato spotted wilt virus. *Cytol Genet* 24:59–65
- Lanfermeijer FC, Warmink J, Hille J (2005) The products of the broken *Tm-2* and the durable *Tm-2<sup>2</sup>* resistance genes from tomato differ in four amino acids. *J Exp Bot* 56:2925–2933
- Laskowska D, Berbec A (2003) Preliminary study of the newly discovered tobacco species *Nicotiana wuttkei* Clarkson et Symon. *Genet Resources Crop Evol* 50(8):835–839
- Laskowska D, Berbec A (2005) Cytology and fertility of viable hybrids of *Nicotiana tabacum* L. cv. TB-566 with *N. alata* Link et Otto. *J Appl Genet* 46(1):11–18
- Laskowska D, Berbec A (2010) TSWV resistance in DH lines of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from a hybrid between 'Polalta' and 'Wiślica'. *Plant Breed* 129:731–733
- Mandal B, Pappu HR, Culbreath AK, Holbrook CC, Todd JW (2002) Differential response of selected peanut (*Arachis hypogaea*) genotypes to mechanical inoculation by *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Dis* 86:939–944
- Moon H, Nicholson JS (2007) AFLP and SCAR markers linked to *Tomato Spotted Wilt Virus* resistance in tobacco. *Crop Sci* 47:1887–1894
- Moury B, Palloix A, Gebre Selassie K, Marchoux G (1997) Hypersensitive resistance to tomato spotted wilt virus in

- three *Capsicum chinense* accessions is controlled by a single gene and is overcome by virulent strains. *Euphytica* 94:45–52
- Moury B, Gebre Selassie K, Marchoux G, Daubèze A-M, Palloix A (1998) High temperature effects on hypersensitive resistance to tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) in pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Eur J Plant Pathol* 5:489–498
- Mumford RA, Barker I, Wood KR (1996) The biology of the tospoviruses. *Ann Appl Biol* 128:159–183
- Nagao T (1982) Somatic hybridization by fusion of protoplasts. *Jpn J Crop Sci* 51:35–42
- Opoka B (1969) Odporność dzikich gatunków *Nicotiana* na Lycopersicum virus 3 (Brittlebank) Smith. (komunikat). *Hodowla Roślin Aklimatyzacja i Nasiennictwo* 13(1):83–87
- Palakarcheva M, Yancheva A (1985) Inheritance of resistance to tomato spotted wilt virus (Lycopersicon virus 3 Smith) in tobacco following interspecific hybridization of *Nicotiana tabacum* and *N. sanderae*. *Genet Sel* 18:303–311
- Palakarcheva M, Yancheva A (1989) Genetic sources of resistance to the tomato bronzing pathogen on tobacco in wild species of the genus *Nicotiana* (in Bulgarian). *Genet Breed* 22:473–479
- Parella G, Gognalons P, Gebre-Selassie K, Vovlas C, Marchoux G (2003) An update of the host range of tomato spotted wilt virus. *J Plant Pathol* 85(4, Special issue):227–264
- Patrascu M, Paunescu AD (1997) Transfer of the resistance to TSWV from *Nicotiana glauca* to other tobacco cultivars using in vitro culture techniques. *CORESTA Inf Bull* 53
- Pop IV (1979) Reaction of some *Nicotiana* sp. and tobacco varieties to artificial inoculation with tomato spotted wilt virus. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 226:17–26
- Roggero P, Lisa V, Nervo G, Pennazio S (1996) Continuous high temperature can break the hypersensitivity of *Capsicum chinense* 'PI 152225' to tomato spotted wilt tospovirus (TSWV). *Phytopathologia Mediterranea* 35:117–120
- Roggero P, Melani V, Ciuffo M, Tavella L, Tedeschi R, Stravato VM (1999) Two field isolates of tomato spotted wilt tospovirus overcome the hypersensitive response of the pepper (*Capsicum annuum*) hybrid with resistance introgressed from *C. chinense* PI152225. *Plant Dis, Disease. Notes* 83:965
- Rosello S, Diez MJ, Nuez F (1998) Genetics of tomato spotted wilt virus resistance coming from *Lycopersicon peruvianum*. *Eur J Plant Pathol* 104:499–509
- Rosello S, Ricarte B, Diez MJ, Nuez F (2001) Resistance to Tomato spotted wilt virus introgressed from *Lycopersicon peruvianum* in line UPV 1 may be allelic to Sw-5 and can be used to enhance the resistance of hybrid cultivars. *Euphytica* 119:357–367
- Ruter JM, Gitaitis RD (1993) First report of tomato spotted wilt virus on bedding plants in Georgia. *Plant Dis* 77:101
- Scott SW (2012) Host-list of tomato spotted wilt virus and impatiens necrotic spot virus. Horticulture Clemson University <http://www.clemson.edu/hort/sctop/bsec/hosts/hostlist.phb>. Accessed 24 July 2012
- Shcherbatenko IS, Oleshchenko LT (2006) Somaclonal variation as a source of tomato spotted wilt virus—resistance in plants. In: Cooper I et al (eds) *Virus diseases and crop biosecurity*. Springer, Dordrecht, pp 133–144
- Skucińska G, Miszka W, Kruczkowska H (1977) Studies on the use of interspecific hybrids in tobacco breeding. I. Obtaining of fertile hybrids by propagation in vitro. *Acta Biologica Cracoviensia Ser Botanica* 20:81–88
- Soler S, Diez MJ, Nuez F (1998) Effect of temperature regime and growth stage interaction on pattern of virus presence in tomato spotted wilt virus resistant accessions of *Capsicum chinense*. *Plant Dis* 82:1199–1204
- Soler S, Diez MJ, Rosello S, Nuez F (1999) Movement and distribution of tomato spotted wilt virus in resistant and susceptible accessions of *Capsicum* spp. *Can J Plant Pathol* 21:317–325
- Stevens MR, Scott SJ, Gergerich RC (1992) Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica* 59:9–17
- Stoyanova MP (1979) Resultats de L'Hybridation Entre les Especies *Nicotiana tabacum* L. et *Nicotiana glauca* Link. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences* 32(5):683–686
- Tsakiridis JP, Gooding GV (1972) Tomato spotted wilt virus in Greece. *Phytopathologia Mediterranea* 11(1):42–47
- Wijkamp I, Van Lent J, Kormelink R, Goldbach R, Peters D (1993) Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. *J Gen Virol* 74:341–349
- Yancheva A (1990) A possibility for transferring combined resistance to tomato spotted wilt virus and *Thielaviopsis basicola* to intercultivar tobacco hybrids (in Bulgarian). *Genet Breed* 23(3):194–199



<https://doi.org/10.17221/81/2017-CJGPB>

## Reaction of *Nicotiana* Species and Cultivars of Tobacco to Tobacco mosaic virus and Detection of the *N* Gene that Confers Hypersensitive Resistance

ANNA DEPTA, KAROLINA KURSA, TERESA DOROSZEWSKA,  
DOROTA LASKOWSKA and ANNA TROJAK-GOLUCH\*

Department of Plant Breeding and Biotechnology, Institute of Soil Science and Plant  
Cultivation, State Research Institute, Pulawy, Poland

\*Corresponding author: [anngol@iung.pulawy.pl](mailto:anngol@iung.pulawy.pl)

### Abstract

Depta A., Kursa K., Doroszevska T., Laskowska D., Trojak-Goluch A. (2018): Reaction of *Nicotiana* species and cultivars of tobacco to *Tobacco mosaic virus* and detection of the *N* gene that confers hypersensitive resistance. Czech J. Genet. Plant Breed., 54: 143–146.

*Tobacco mosaic virus* (TMV) causes large losses in tobacco cultivation. Sixty-two cultivars of tobacco and eleven species of *Nicotiana* were evaluated for resistance to TMV. Biological tests at two temperature ranges, DAS-ELISA and molecular markers were applied to assess the resistance to TMV. Most cultivars of tobacco were susceptible (S) to TMV, two were tolerant (T), while others revealed a hypersensitive response (HR). Hypersensitivity, determined by the *N* gene, occurred only at a temperature below 22°C. At a temperature above 28°C, all the cultivars showed mosaic discolorations or extensive necrosis. The reaction of the *Nicotiana* species was dependent on growth conditions. At 22°C, the reactions of susceptibility, tolerance and hypersensitivity to TMV were all observed, whereas above 28°C the species showed systemic necrotic symptoms. *N. gossei* was an exception in that hypersensitivity occurred regardless of the thermal conditions. The resistance of this species was not conditioned by the *N* gene, which suggests that *N. gossei* could be an additional genetic resource for tobacco breeding.

**Keywords:** genetic resources; *Nicotiana gossei*; *Nicotiana tabacum*; TMV

*Tobacco mosaic virus* (TMV) is a serious problem in tobacco cultivation in Poland (data not published) and in other countries in a warm or moderate climate zone. The lack of resistance to TMV in the Virginia type tobacco is becoming increasingly problematic due to the consistent propagation of the virus under field conditions combined with its high durability and ease of spread. Tobacco breeders previously used the Ambalema cultivar as a source of resistance to TMV. Its resistance was and still is controlled by two recessive alleles and a number of modifying genes (CLAYTON *et al.* 1938). However, plants with Ambalema-type resistance were not virus-free and exhibited mosaic symptoms at temperatures above

28°C. The species *Nicotiana glutinosa*, characterized by the hypersensitive response (HR), conditioned by a single *N* gene with a dominant resistance allele, is an alternative source of resistance to TMV (GWYNN 1977). However, at temperatures above 28°C the HR resistance of this species stops functioning and plants become systemically infected (WHITE & SUGARS 1996). Only a few resistant cultivars of the Virginia type were grown based on *glutinosa*-type resistance, because the occurrence of the *N* gene negatively affects the physical and chemical properties of the leaves (LEWIS *et al.* 2005). Within the genus *Nicotiana*, excluding for *N. glutinosa*, the potential sources of TMV resistance are *N. repanda*,

*N. gossei*, *N. langsdorfii*, *N. rustica* (VALLEAU 1952; GWYNN 1977; YUAN *et al.* 2015) and *N. benthamiana*, *N. maritima*, *N. sanderiae*, *N. velutina*, *N. acuminata*, *N. goodspeedii*, *N. forgetiana*, *N. nesophila*, *N. stocktonii* (VAN DIJK & CUPERUS 1989; YUAN *et al.* 2015). However, these reports do not provide the names of the TMV strains used for plant inoculation or the temperature settings of the experiments. Moreover, the evaluation of resistance was performed only on the basis of the presence or absence of disease symptoms.

In our study a comprehensive assessment has been conducted on a wide group of tobacco cultivars, combined with molecular detection of the *N* gene and the effect of temperature on plant resistance. Additionally, resistance tests were done for cultivars and *Nicotiana* species where contradictory or incomplete results had been found.

The plant material consisted of 11 wild species of *Nicotiana* and 62 cultivars of *N. tabacum* belonging to the oriental, dark-cured, Burley and Virginia types of tobacco. The influence of temperature on the immune response of plants to TMV was evaluated. For this purpose an isolate of the TMV-vulgare (PV-0107) CMI/AAB. Descr. Pl. virus was multiplied in the susceptible cv. Wiślica. Sap from the infected Wiślica cv. was rubbed onto the carborundum dusted leaves of six plants of each accession. Plants were placed in two growth chambers, one with a low temperature: day 22°C for 14 h and night 20°C for 10 h; and one with a high temperature: day 30°C for 14 h, and night 28°C for 10 h. Tobacco plants were inoculated at the 5–6 leaf stage. The disease symptoms were observed 5, 10, and 14 days after inoculation (DPI). Then DAS-ELISA tests using antibodies from BIOREBA were applied. Samples were taken from inoculated leaves and the upper parts of plants.

The presence of the *N* gene was detected using a PCR reaction. DNA was extracted by the CTAB method in accordance with the modified protocol described by CZUBACKA & DOROSZEWSKA (2010). DNA amplification was carried out using a PCR reaction with two pairs of E (5'-ACCAGAATGATATGTTCCAC-3' and 5'-GGACTCAACGTTAATTCTCTG-3') and N (5'-CGTCGACACATTATGCCATC-3' and 5'-GAGGGGTCTTACCCCATTTGT-3') primers previously described by LEWIS *et al.* (2005). The PCR reaction mixture was prepared in 20 µl and contained 1 µl of plant DNA and 2 µl of PCR buffer (10×), 1.6 µl of 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6 µl of 10 mM dNTPs, 0.5 µl of each primer (10 µM each), and 0.4 µl of Taq DNA

polymerase (5 U/µl). The PCR reaction consisted of initial denaturation at 94°C for 1 min followed by 35 cycles: 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min and a final elongation step of 72°C for 7 min.

There were four types of responses to the virus, depending on the tested accession and the conditions of the experiment. The most frequent reaction among the cultivars of the Virginia type and the oriental types was susceptibility (S). ELISA absorbance values obtained in the samples from these plants ranged from 2.234 to 3.096. This type of reaction was observed in the majority of the tested cultivars of *N. tabacum* under each of the applied temperatures (Table 1). Another group of accessions, the Ambalema 1 and Ambalema 2 cultivars and the *Nicotiana* species *N. glauca*, *N. wigandoides* and *N. africana* exhibited a varied reaction to TMV that depended on the air temperature. At the temperature 20/22°C they exhibited no disease symptoms in the bottom and upper leaves and simultaneously they had high absorbance values ranging from 1.938 to 2.367. At the temperature 28/30°C strong mosaic discolorations were detected and ELISA absorbance was within the range of 2.361 to 3.071, which is similar to that obtained in susceptible cultivars. These results suggest tolerance to TMV that is temperature sensitive. Due to the above facts, Ambalema 1 and 2 from our collection do not constitute any effective and stable sources of resistance to TMV. A hypersensitive response (HR), characterized by small necrotic spots around the place of infection, was recorded in 14 cultivars belonging mainly to the Burley and oriental types. In the group of the Virginia type only cv. Vamorr 50 showed HR resistance. Molecular analyses using E and N primers have shown that the resistance of all these cultivars was determined by the *N* gene derived from *N. glutinosa*. However, the number of cultivars showing HR response was dependent on thermal conditions. Temperatures above 28°C promoted the multiplication and translocation of the virus to the upper levels of plants and the occurrence of systemic reactions. This was probably due to a decrease in the level of the thermosensitive proteins (IVR) that prevent virus replication (GERA *et al.* 1993). This indicates that using the *N* gene for developing resistance in tobacco breeding may not be a sufficient solution, especially under conditions of global warming and the increasing occurrence of TMV worldwide. The most frequent reaction among the *Nicotiana* species was hypersensitivity. Species reacting to TMV with necrotic spots included:

<https://doi.org/10.17221/81/2017-CJGPB>

*N. maritima*, *N. goodspeedii*, *N. repanda*, *N. gosseii*, *N. benthamiana*, *N. langsdorfii* and *N. glutinosa* (Table 1). Serological tests revealed the presence of the virus only in the lower leaves within the necrotic spots. The upper leaves without any visible symptoms did not contain the virus (ELISA values 0.063–0.114). However, the occurrence of HR was recorded only with temperatures not exceeding 22°C. With temperatures above 28°C, plants developed a systemic response which was characterized by extensive necroses and shoot top withering. ELISA of these plants confirmed the presence of the virus in both the lower and the

upper leaves. The obtained results are consistent with the observations of VALLEAU (1952); GWYNN (1977) and YUAN *et al.* (2015), who screened *Nicotiana* species using TMV and stated that they may be used in tobacco breeding. Molecular analyses gave an overview of the occurrence of the *N* gene among selected species of *Nicotiana*. PCR products were obtained only in the case of the hypersensitive *N. glutinosa*. In the other species, no DNA fragment was found proving the presence of the *N* gene.

Among the tested species, of special interest is *N. gossei* which showed a hypersensitivity reaction to

Table 1. The assessment of the resistance of tobacco cultivars and *Nicotiana* species under inoculation with TMV

Cultivar	Temperature (°C)				P <sub>N-gene</sub>	
	20/22		28/30		E	N
	R <sub>TMV</sub>	N <sub>ilt</sub>	R <sub>TMV</sub>	N <sub>ilt</sub>		
<b>Oriental type</b>						
Basma 153, CNR 12450, Diubek, Diubek 44, Djebel 139, Newrokop 1561, Newrokop 5 (T.130), Newrokop 5 (T.167), Ustina 2, Samsun, Samsun 27, Samsun 417, Samsun 935, Samsun de Katherini, Samsun Odskok, Talgar 30, Trapezund 245, Trapezund 2578, Trapezund 41, Trapezund Puławski 93, Trapezund WITIM 93	S	6/6	S	6/6	–	–
Diubek 556 (T.743), Diubek 556 (T.803), Newrokop 261 (T.677), Newrokop 261 (T.740), Samsun 155, Samsun H	HR	0/6	SNR	6/6	+	+
<b>Dark-cured type</b>						
Polalta	S	6/6	S	6/6	–	–
Ambalema (1)	T	6/6	S	6/6	–	–
Ambalema (2)	T	6/6	S	6/6	–	–
Immunnyj 580	HR	0/6	SNR	6/6	+	+
<b>Burley type</b>						
Burley 165, BY 103, Burley Har.Velvet, TN 86	S	6/6	S	6/6	–	–
(ms 21 × Ky 10) × Ky 10, Bu 563, Burley 21, Ky 10, KY 908, Sota 27	HR	0/6	SNR	6/6	+	+
<b>Virginia type</b>						
Vamorr 50	HR	0/6	SNR	6/6	+	+
974 (Hicks Resistant), AC Gayed, Broad Leaf Hicks, Coker 140, Coker 347, Hicks Fixed A2, Hicks Resistant (T.581), Hicks z Ontario, Mc Nair 1040, Mc Nair 944, V. Gold Dollar, V. Golta, V. Sun Cured, Weneda, Wenus, White Mammoth, Wiera, Wisana, Wiślica	S	6/6	S	6/6	–	–
<b><i>Nicotiana</i> species</b>						
<i>N. glauca</i> , <i>N. africana</i> , <i>N. wigandioides</i>	T	6/6	S	6/6	–	–
<i>N. maritima</i> , <i>N. goodspeedii</i> , <i>N. repanda</i> , <i>N. benthamiana</i> , <i>N. langsdorfii</i>	HR	0/6	SNR	6/6	–	–
<i>N. glutinosa</i>	HR	0/6	SNR	6/6	+	+
<i>N. gossei</i>	HR	0/6	HR	0/6	–	–
<i>N. rustica</i>	SNR	6/6	SNR	6/6	–	–

R<sub>TMV</sub> – response to *Tobacco mosaic virus* (TMV); N<sub>ilt</sub> – number of plants per each accession containing TMV in upper leaves (a high antibody titre in ELISA)/tested plants; P<sub>N-gene</sub> – presence of *N* gene confirmed with primer pairs E or N; SNR – systemic necrotic response; T – tolerance; HR – hypersensitive response; S – susceptibility

<https://doi.org/10.17221/81/2017-CJGPB>

TMV. Necrotic spots were formed on the inoculated leaves, but systemic spread of the virus was suppressed. TMV was not detected in the upper leaves even at the high temperatures. No previous studies have shown that the resistance of *N. gossei* is stable and effective regardless of the thermal conditions. Furthermore, our studies demonstrated that it is not determined by the *N* gene, which indicates the presence of a new mechanism of resistance in the genus *Nicotiana*.

### References

- Clayton E.E., Smith H.H., Foster H.H. (1938): Mosaic resistance in *Nicotiana tabacum* L. *Phytopathology*, 28: 286–288.
- Czubacka A., Doroszewska T. (2010): Combination of different sources of resistance to PVY in tobacco doubled haploids. In: Proc. CORESTA Joint Study Groups Meeting, Edinburgh, Sept, 12–16, 2010: AP-08.
- Gera A., Tam Y., Teverovsky E., Loebenstein G. (1993): Enhanced tobacco mosaic virus production and suppressed synthesis of the inhibitor of virus replication in protoplasts and plants of local lesion responding cultivars exposed to 35°C. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 43: 299–306.
- Gwynn G.R. (1977): Evaluation of tobacco mosaic virus resistant germplasm. *Tobacco Research*, 3: 89–94.
- Lewis R.S., Milla S.R., Levin J.S. (2005): Molecular and genetic characterization of *Nicotiana glutinosa* L. chromosome segments in tobacco mosaic virus-resistant tobacco accessions. *Crop Science*, 45: 2355–2362.
- Valleau W.D. (1952): Breeding tobacco for disease resistance. *Economic Botany*, 6: 69–102.
- Van Dijk P., Cuperus C. (1989): Reactions on *Nicotiana* species to potato viruses A, X and Y and tobacco mosaic virus in relation to their taxonomy and geographical origin. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 95: 343–356.
- White R.E., Sugars J.M. (1996): The systemic infection by tobacco mosaic virus of tobacco plants containing the *N* gene at temperatures below 28°C. *Journal of Phytopathology*, 144: 139–142.
- Yuan X., Yan Ch., Wu Z., Ren F., Zhang H., Baker B., Chen J., Kuang H. (2015): Frequent gain and loss of resistance against *Tobacco mosaic virus* in *Nicotiana* species. *Molecular Plant*, 8: 1813–1815.

Received for publication May 31, 2017

Accepted after corrections January 10, 2018

Published online March 9, 2018

### **13.Oświadczenie doktoranta i współautorów dotyczące wkładu w przygotowanie publikacji**

## Oświadczenie doktoranta jako współautora publikacji

Mgr inż. Anna Depta

Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

1. Doroszevska T., Depta A. 2011. Resistance of wild *Nicotiana* species to different PVY isolates. *Phytopathologia*, 59: 9-24.  
Mój udział w przygotowaniu publikacji wynosił 60% i polegał na opracowaniu koncepcji i metodyki badań, interpretacji i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu maszynopisu.
2. Depta A., Doroszevska T., Czubačka A. 2020. Zróźnicowanie reakcji odpornościowej wybranych odmian tytoniu (*Nicotiana tabacum*) w zależności od użytego izolatu wirusa Y ziemniaka”. *Polish Journal of Agronomy*, 42, 3-13.  
Mój udział w przygotowaniu publikacji wynosił 70% i polegał na opracowaniu koncepcji i metodyki badań, prowadzeniu doświadczenia, interpretacji wyników i przygotowaniu maszynopisu oraz odpowiedzi na recenzje.
3. Depta A., Doroszevska T., Czubačka A. 2021 Resistance response of the recently discovered species *Nicotiana mutabilis* to *Potato virus Y* (PVY) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) compared to other sources of resistance. *Agronomy*, 11(8): 1617.  
Mój udział w przygotowaniu publikacji wynosił 90% i polegał na opracowaniu koncepcji i metodyki badań, prowadzeniu doświadczenia, interpretacji i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu maszynopisu i odpowiedzi na recenzje.
4. Laskowska D., Doroszevska T., Depta A., Kursa K., Olszak-Przybyś H., Czubačka A. 2013. A survey of *Nicotiana* germplasm for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). *Euphytica*, 193 (2): 207-219.  
Mój udział w przygotowaniu publikacji wynosił 50% i polegał na współdziałaniu w opracowaniu koncepcji badań, prowadzeniu doświadczenia, interpretacji wyników oraz przygotowaniu maszynopisu.
5. Depta A., Kursa K., Doroszevska T., Laskowska D., Trojak-Goluch A. 2018. Reaction of *Nicotiana* species and cultivars of tobacco to *Tobacco Mosaic Virus* and detection of the *N* gene that confers hypersensitive resistance. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 54 (3): 143-146.  
Mój udział w przygotowaniu publikacji wynosił 70% i polegał na opracowaniu koncepcji i metodyki badań, prowadzeniu doświadczenia, interpretacji wyników i pomocy w przygotowaniu maszynopisu.

Data .....

19.06.2023

.....  
Anne Depta

(podpis autora pracy)

## Oświadczenie współautora publikacji doktoranta

**Prof. dr hab. Teresa Doroszevska**

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy

W związku z ubieganiem się mgr inż. Anny Depty o stopień doktora nauk rolniczych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

1. Doroszevska T., Depta A. 2011. Resistance of wild *Nicotiana* species to different PVY isolates. *Phytopathologia*, 59: 9-24.  
Mój udział w przygotowaniu publikacji wynosił 40% i polegał na merytorycznym nadzorze przy planowaniu i prowadzeniu badań, pomocy w interpretacji wyników i korekcie merytorycznej maszynopisu.
2. Depta A., Doroszevska T., Czubačka A. 2020. Zróżnicowanie reakcji odpornościowej wybranych odmian tytoniu (*Nicotiana tabacum*) w zależności od użytego izolatu wirusa Y ziemniaka”. *Polish Journal of Agronomy*, 42, 3-13.  
Mój udział w przygotowaniu publikacji wynosił 20% i polegał na merytorycznym nadzorze przy planowaniu i prowadzeniu doświadczenia będącego tematem publikacji i weryfikacji treści maszynopisu.
3. Depta A., Doroszevska T., Czubačka A. 2021 Resistance response of the recently discovered species *Nicotiana mutabilis* to *Potato virus Y* (PVY) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) compared to other sources of resistance. *Agronomy*, 11(8): 1617.  
Mój udział w przygotowaniu publikacji wynosił 5% i polegał na merytorycznym nadzorze badań.
4. Laskowska D., Doroszevska T., Depta A., Kurska K., Olszak-Przybyś H., Czubačka A. 2013. A survey of *Nicotiana* germplasm for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). *Euphytica*, 193 (2): 207-219.  
Mój udział w przygotowaniu publikacji wynosił 7% i polegał na merytorycznym nadzorze przy prowadzeniu doświadczenia.
5. Depta A., Kurska K., Doroszevska T., Laskowska D., Trojak-Goluch A. 2018. Reaction of *Nicotiana* species and cultivars of tobacco to *Tobacco Mosaic Virus* and detection of the *N* gene that confers hypersensitive resistance. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 54 (3): 143-146.  
Mój udział w przygotowaniu publikacji wynosił 6% i polegał na merytorycznym nadzorze doświadczenia.

Data 20.06.2023

Doroszevska.....

(podpis osoby składającej oświadczenie)

## Oświadczenie współautora publikacji doktoranta


dr Anna Czubacka

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy

W związku z ubieganiem się mgr inż. Anny Depty o stopień doktora nauk rolniczych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

1. Depta A., Doroszevska T., Czubacka A. 2020. Zróżnicowanie reakcji odpornościowej wybranych odmian tytoniu (*Nicotiana tabacum*) w zależności od użytego izolatu wirusa Y ziemniaka”. Polish Journal of Agronomy, 42, 3-13.  
Mój udział w przygotowaniu publikacji wynosił 10% i polegał na pomocy przy interpretacji wyników i pomocy przy przygotowaniu maszynopisu.
2. Depta A., Doroszevska T., Czubacka A. 2021. Resistance response of the recently discovered species *Nicotiana mutabilis* to *Potato virus Y* (PVY) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) compared to other sources of resistance. Agronomy, 11(8): 1617.  
Mój udział w przygotowaniu publikacji wynosił 5% i polegał na weryfikacji treści artykułu.
3. Laskowska D., Doroszevska T., Depta A., Kurska K., Olszak-Przybyś H., Czubacka A. 2013. A survey of *Nicotiana* germplasm for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Euphytica, 193 (2): 207-219.  
Mój udział w przygotowaniu publikacji wynosił 4% i polegał na pomocy przy interpretacji wyników.

Data ..... 20.06.2023 .....

.....  .....

(podpis osoby składającej oświadczenie)



## Oświadczenie współautora publikacji doktoranta

**dr hab. Anna Trojak-Goluch**

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy

W związku z ubieganiem się mgr inż. Anny Depty o stopień doktora nauk rolniczych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

1. Depta A., Kursa K., Doroszevska T., Laskowska D., Trojak-Goluch A. 2018. Reaction of *Nicotiana* species and cultivars of tobacco to *Tobacco Mosaic Virus* and detection of the *N* gene that confers hypersensitive resistance. Czech J. Genet. Plant Breed. 54 (3): 143-146.  
Mój udział w przygotowaniu publikacji wynosił 20% i polegał na pomocy w przygotowaniu maszynopisu.

Data ..... 20.06.2023

..... Anna Trojak-Goluch  
(podpis osoby składającej oświadczenie)

## Oświadczenie współautora publikacji doktoranta

Mgr Hanna Olszak-Przybyś

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy

W związku z ubieganiem się mgr inż. Anny Depty o stopień doktora nauk rolniczych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

1. Laskowska D., Doroszevska T., Depta A., Kursa K., Olszak-Przybyś H., Czubacka A. 2013. A survey of *Nicotiana* germplasm for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). *Euphytica*, 193 (2): 207-219.

Mój udział w przygotowaniu publikacji wynosił 4% i polegał na pomocy przy prowadzeniu doświadczenia.

Data 20.06.2023.....

Hanna Olszak-Przybyś.....

(podpis osoby składającej oświadczenie)

## Oświadczenie współautora publikacji doktoranta

Mgr Karolina Kursa

Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy  
(aktualnie nie pracuje w IUNG-PIB)

W związku z ubieganiem się mgr inż. Anny Depty o stopień doktora nauk rolniczych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

1. Laskowska D., Doroszevska T., Depta A., Kursa K., Olszak-Przybyś H., Czubačka A. 2013. A survey of *Nicotiana* germplasm for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). *Euphytica*, 193 (2): 207-219.

Mój udział w przygotowaniu publikacji wynosił 5% i polegał na pomocy przy prowadzeniu doświadczenia.

2. Depta A., Kursa K., Doroszevska T., Laskowska D., Trojak-Goluch A. 2018. Reaction of *Nicotiana* species and cultivars of tobacco to *Tobacco Mosaic Virus* and detection of the *N* gene that confers hypersensitive resistance. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 54 (3): 143-146.

Mój udział w przygotowaniu publikacji wynosił 2% i polegał na pomocy przy prowadzeniu doświadczenia.

Data .....14.06.2023.....

.....Kursa Karolina.....

(podpis osoby składającej oświadczenie)

## Oświadczenie współautora publikacji doktoranta

**dr Dorota Laskowska**

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy  
(obecnie na emeryturze)

W związku z ubieganiem się mgr inż. Anny Depty o stopień doktora nauk rolniczych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

1. Laskowska D., Doroszevska T., Depta A., Kursa K., Olszak-Przybyś H., Czubacka A. 2013. A survey of *Nicotiana* germplasm for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). *Euphytica*, 193 (2): 207-219.

Mój udział w przygotowaniu publikacji wynosił 30% i polegał na opracowaniu koncepcji i metodyki badań oraz udziale w przygotowaniu maszynopisu.

2. Depta A., Kursa K., Doroszevska T., Laskowska D., Trojak-Goluch A. 2018. Reaction of *Nicotiana* species and cultivars of tobacco to *Tobacco Mosaic Virus* and detection of the *N* gene that confers hypersensitive resistance. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 54 (3): 143-146.

Mój udział w przygotowaniu publikacji wynosił 2% i polegał na pomocy w opracowaniu koncepcji pracy.

Data 01.06.2023,

Dorota Laskowska

(podpis osoby składającej oświadczenie)

## **14. Oświadczenie promotora, promotora pomocniczego i autora rozprawy doktorskiej**

**prof. dr hab. Teresa Doroszevska**  
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin  
IUNG-PIB w Puławach  
ul. Czartoryskich 8  
24-100 Puławy

## **OŚWIADCZENIE PROMOTORA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska pt.: „**Ocena zasobów genowych rodzaju *Nicotiana* pod względem odporności na najważniejsze choroby wirusowe tytoniu.**” autorstwa Pani **mgr inż. Anny Depty** została przygotowana pod moim kierunkiem.

Stwierdzam, że niniejsza praca doktorska spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk rolniczych.

Puławy, dn. *21. 06* 2023 r.

*T. Doroszevska*  
.....

(podpis promotora pracy)

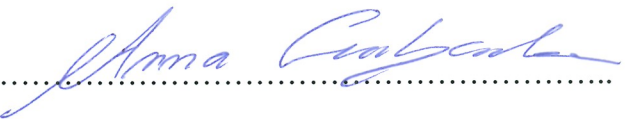
**dr Anna Czubacka**  
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin  
IUNG-PIB w Puławach  
ul. Czartoryskich 8  
24-100 Puławy

## **OŚWIADCZENIE PROMOTORA POMOCNICZEGO ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska pt.: „**Ocena zasobów genowych rodzaju *Nicotiana* pod względem odporności na najważniejsze choroby wirusowe tytoniu**” autorstwa Pani **mgr inż. Anny Depty** została przygotowana pod moim kierunkiem.

Stwierdzam, że niniejsza praca doktorska spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk rolniczych.

Puławy, dn. 21.06 2023

  
.....

(podpis promotora pomocniczego pracy)

## Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

**Anna Depta**

imię i nazwisko autora

Oświadczam, że moja rozprawa doktorska pt.:

**„Ocena zasobów genowych rodzaju *Nicotiana* pod względem odporności na najważniejsze choroby wirusowe tytoniu”** wykonana pod nadzorem merytorycznym promotora **prof. dr hab. Teresy Doroszewskiej** w Zakładzie Hodowli i Biotechnologii Roślin Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa - PIB w Puławach

- a) została przygotowana przeze mnie samodzielnie (z uwzględnieniem merytorycznego wkładu promotora),
- b) nie narusza praw autorskich w rozumieniu ustawy z dnia 4 lutego 1994 roku o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz. U. 2018, poz. 1191 z późn. zm.) oraz dóbr osobistych chronionych prawem cywilnym,
- c) nie zawiera danych i informacji, które uzyskałam/łem w sposób niedozwolony,
- d) nie była podstawą innego postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora.

Ponadto oświadczam, że treść rozprawy doktorskiej przedstawionej przeze mnie do recenzji, zawarta na przekazywanym nośniku elektronicznym, jest identyczna z jej wersją drukowaną.

Puławy, dn. ...20.06.2023

...Anna Depta.....  
czytelny podpis autora