

DOROTA LASKOWSKA

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa — Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

Dziedziczenie odporności na TSWV nowej linii hodowlanej tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.)

Inheritance of TSWV resistance in a new tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) breeding line

Tomato spotted wilt virus (TSWV), powodujący brązową plamistość pomidora, występuje na całym świecie, atakując 1090 gatunków roślin. Najbardziej efektywną metodą ograniczenia strat ekonomicznych powodowanych przez tę chorobę jest wyhodowanie odmian odpornych. W IUNG-PIB w Puławach uzyskano linię hodowlaną tytoniu, charakteryzującą się wysoką odpornością na TSWV. Celem badań było określenie sposobu dziedziczenia czynnika odporności, występującego u linii L-9. W wyniku obustronnych krzyżowań linii L-9 z podatną odmianą Wiślica otrzymano pokolenie F₁, z którego powstały krzyżówki wsteczne z rodzicem odpornym i podatnym oraz pokolenie F₂. Uzyskane populacje przetestowano pod względem odporności na TSWV w warunkach szklarniowych, metodą mechanicznej inokulacji izolatem wirusa pochodzącym z plantacji produkcyjnych tytoniu. Obecność TSWV sprawdzano metodą DAS-ELISA. Stwierdzono dominujący charakter odporności i brak wpływu czynnika matecznego na ujawnianie się tej cechy. Segregacja fenotypów odpornych i podatnych w krzyżówkach testowych potwierdziła hipotezę o jednogenowym sposobie dziedziczenia odporności na TSWV pochodzącej z linii L-9.

Słowa kluczowe: *Nicotiana tabacum* L., *Tomato spotted wilt virus*, gen odporności na chorobę, tytoń szlachetny, dziedziczenie

Tomato spotted wilt virus (TSWV) has been reported worldwide in a 1090 different host species. The most effective way to minimize the damage of this disease is to develop resistance of the field crops. The tobacco breeding line developed in IUNG-PIB in Puławy exhibits a high level of TSWV resistance. The objective of this study was to investigate the inheritance of the resistance present in the L-9 line. The resistant parental L-9 line and susceptible cultivar Wiślica were crossed in both directions to create F₁ hybrids, from which backcrosses with resistant and susceptible parent were made and F₂ generation were obtained. All populations were evaluated for response to artificial inoculation with one TSWV isolate of local origin, in greenhouse conditions. The presence of the virus was verified using DAS-ELISA. A dominant character and no material effect were stated for the resistance trait. Segregation ratios of resistant and susceptible phenotypes in the testing crosses were in agreement with the hypothesis that inheritance of TSWV resistance of the L-9 line is dominant and monogenic.

Key words: *Nicotiana tabacum* L., *Tomato spotted wilt virus*, disease resistance gene, tobacco, inheritance

WSTĘP

Tomato spotted wilt virus (TSWV), powodujący brązową plamistość pomidora, należy do rodzaju *Tospovirus*, rodziny *Bunyaviridae* (Francki i in., 1991). Jest to wirus o bardzo szerokim zasięgu geograficznym, który atakuje 1090 gatunków roślin, należących do 85 rodzin botanicznych (Parella i in., 2003). W Polsce TSWV może występować na takich roślinach użytkowych jak: pomidory, papryka, groch, bób, seler, sałata, cykoria, cebula, por, dalia, chryzantema, gerbera, irys, a z upraw rolniczych atakuje głównie tytoń. TSWV powoduje na roślinach tytoniu chlorozy i nekrozy liści i łodyg, żółknięcie i deformację wierzchołka oraz przedwczesną śmierć roślin, przyczyniając się do dużych strat ekonomicznych (Mumford i in., 1996). W Europie Środkowej i Wschodniej tytoń jest infekowany wirusem TSWV za pośrednictwem wciornastka tytoniowca (*Thrips tabaci* Lindeman) (Jenser i Szenasi, 2004; Zawirska, 1979), natomiast w Europie Zachodniej oraz prawie wszystkich pozostałych rejonach świata — za pośrednictwem gatunków z rodzaju *Frankliniella* (Marchoux, 1990; Ullman i in., 1997). Do infekowania tytoniu w Polsce zdolne są wyłącznie populacje biseksualne podgatunku *T. tabaci tabaci* Lind (Zawirska, 1979). Specjalizacja tego podgatunku do żerowania na tytoniu prawdopodobnie powoduje, że nie przenosi on TSWV na uprawy ziemniaka czy pomidora. Od końca lat osiemdziesiątych TSWV staje się w Polsce poważnym problemem w uprawie roślin pod osłonami. Kamińska i Korbin (1993) wiążą to z masowym importem w tym czasie roślin ozdobnych i sprowadzeniem wraz z nimi nowego wektora choroby — wciornastka zachodniego (*Frankliniella occidentalis* Pergande), który w polskich warunkach klimatycznych może przetrwać zimę jedynie w szklarni.

Metodami hodowli konwencjonalnej nie udało się dotychczas uzyskać odpornych na TSWV odmian produkcyjnych tytoniu szlachetnego (*Nicotiana tabacum* L.), charakteryzujących się dobrymi cechami użytkowymi. Źródła odporności na TSWV w świecie roślinnym są bardzo rzadkie. U papryki gen odporności nazwany *Tsw*, został wprowadzony z *Capsicum chinense* do *C. annuum* (Boiteux i de Avilla, 1994), natomiast u pomidora odporność uwarunkowaną genem *Sw-5* przeniesiono z *Lycopersicon peruvianum* do *L. esculentum* (Stevens i in., 1992). W rodzaju *Nicotiana*, *N. alata* Link et Otto charakteryzuje się odpornością na brązową plamistość pomidora (Jankowski, 1980; Laskowska i Berbeć, 2006), lecz wykorzystanie tego gatunku w hodowli jest trudne ze względu na bariery występujące przy krzyżowaniu z tytoniem uprawnym. W Polsce wyhodowano odmianę Polalta, z odpornością pochodzącą od *N. alata*, która została zarejestrowana w latach 90. XX wieku (Gajos, 1981, 1988; Lista odmian..., 2002). Odmiana ta nie jest uprawiana ze względu na słabą wartość użytkową. W jej potomstwie, uzyskanym w wyniku krzyżowania z innymi genotypami tytoniu, ujawniają się deformacje morfologiczne, spowodowane prawdopodobnie oddziaływaniem materiału genetycznego, pochodzącego od *N. alata* (Kennedy i Nielsen, 1993; Moon i Nicholson, 2007). Tak zwane guzy genetyczne powstają u niektórych mieszańców międzygatunkowych tytoniu jako narośla niezróżnicowanej tkanki lub deformacje liści czy kwiatostanu (Ahuja, 1998; Smith, 1988). Na bazie odporności pochodzącej od odmiany Polalta wyhodowano w IUNG-PIB w Puławach, przy zastosowaniu androgenezy *in vitro* a następnie podwojenia liczby

chromosomów, linię L-9, charakteryzującą się znacznie polepszoną morfologią w porównaniu z odmianą wyjściową.

Celem pracy było określenie sposobu dziedziczenia czynnika odporności na TSWV, występującego u tej linii hodowlanej tytoniu.

MATERIAŁ I METODY

Wyjściowy materiał roślinny stanowiły: linia L-9, odporna na TSWV (O) oraz odmiana Wiślica, wzorcowa dla typu Virginia, podatna na TSWV (P). Do oceny dziedziczenia cechy odporności wykorzystywano:

- dwa rodzaje mieszańców F_1 otrzymanych w wyniku obustronnego krzyżowania odpornej i podatnej formy rodzicielskiej ($F_{1(O \times P)}$ oraz $F_{1(P \times O)}$),
- cztery populacje krzyżówek wstecznych utworzonych na bazie pokolenia F_1 : $BC_{1(O \times P)O}$, $BC_{1(P \times O)O}$, $BC_{1(O \times P)P}$, $BC_{1(P \times O)P}$,
- dwie populacje F_2 , które powstały w wyniku samozapylenia F_1 ($F_{2(O \times P)}$ i $F_{2(P \times O)}$).

Ocenę odporności na TSWV przeprowadzano w szklarni na roślinach w fazie około 6 liści, metodą opisaną przez Tsakiridis i Gooding (1972). Polegała ona na mechanicznej inokulacji filtratem z zakażonych roślin, pochodzących z plantacji produkcyjnych tytoniu, położonych w województwie świętokrzyskim. Kontrolne rośliny niezakażone (dwie z każdego genotypu) były inokulowane wyłącznie buforem fosforanowym z karborundem. Były one używane w teście ELISA jako kontrola negatywna. Obecność wirusa w testowanych roślinach analizowano standardową metodą DAS-ELISA przy użyciu komercyjnych poliklonalnych przeciwciał przeciwko białkom TSWV (Bioreba AG, Szwajcaria). Z każdej testowanej rośliny pobierano po dwie próbki z liści wierzchołkowych. Około 100 ml tkanki liściowej rozcierano w 1 ml buforu PBS-TPO. Inkubację z roztworem 4-fosforanu p-nitrofenylu prowadzono w temperaturze pokojowej w ciemności przez 30 minut. Absorbancję mierzono przy 405 nm przy użyciu czytnika wielokanałowego firmy Tecan. Rośliny uważano za podatne (zakażone), jeśli próbki wykazywały średnią wartość absorbancji wyższą niż podwojona wartość dla kontroli negatywnej. Do oceny odporności poszczególnych populacji użyto średnich wartości absorbancji, odczytanych w teście ELISA. Dla porównania obserwowanej i oczekiwanej proporcji fenotypów w krzyżówkach testowych: $BC_{1(O \times P)P}$, $BC_{1(P \times O)P}$, $F_{2(O \times P)}$ i $F_{2(P \times O)}$, zastosowano test chi-kwadrat. Obliczenia przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica 8 firmy StatSoft.

WYNIKI I DYSKUSJA

Po inokulacji TSWV rośliny linii hodowlanej L-9 wykazywały pełną odporność. Test ELISA potwierdził brak wirusa w roślinach tej linii. Wszystkie rośliny kontrolnej odmiany Wiślica uległy porażeniu systemicznemu, a poziom wirusa był bardzo wysoki (absorbancja przy 405 nm — 3,390). W pierwszym pokoleniu mieszańców, zarówno w populacji $F_{1(O \times P)}$ jak i $F_{1(P \times O)}$ porażeniu uległo po około 1% roślin. Niewielki procent roślin porażonych w pokoleniu F_1 świadczy o dominującym działaniu czynnika odporności, a brak

zróźnicowania między populacjami pochodzącymi z krzyżówek dwustronnych — o braku wpływu czynnika matecznego na cechę odporności. W krzyżówkach wstecznych z rodzicem odpornym proporcja fenotypów odpornych do podatnych wynosiła w przybliżeniu 1:0, przy czym w populacji BC_{1(OxP)}O stwierdzono około 2% roślin podatnych, natomiast krzyżówka BC_{1(PxO)}O nie segregowała i wszystkie rośliny były odporne. W krzyżówkach wstecznych z rodzicem podatnym stwierdzono: u BC_{1(OxP)}P — 55 roślin odpornych i 65 podatnych, natomiast w przypadku BC_{1(PxO)}P — 71 roślin odpornych i 57 podatnych, a więc proporcję zbliżoną do 1:1. W obydwu populacjach F₂, mimo pewnych odchyień od wartości oczekiwanych na korzyść roślin podatnych, proporcja fenotypów była zbliżona do 3:1.

Proporcja roślin odpornych i podatnych w krzyżówkach testowych oraz sposób ekspresji tej cechy w pokoleniu F₁ pozwoliły przyjąć hipotezę o jednogenowym dominującym sposobie dziedziczenia cechy odporności na TSWV u linii L-9. Test chi-kwadrat potwierdził tę hipotezę z wystarczającym prawdopodobieństwem, mieszczącym się w granicach 0,1983–0,3767 (tab. 1).

Tabela 1

Segregacja cechy odporności na TSWV w krzyżówkach testowych linii hodowlanej L-9 z odmianą Wiślica
Segregation of TSWV-resistance in testing crosses between the breeding line L-9 and the Wiślica cultivar

Genotyp Genotype	Rośliny obserwowane Observed plants				Oczekiwana proporcja* Odporne : Podatne Expected ratio Resistant : Susceptible	χ ²	P**
	odporne — resistant		podatne — susceptible				
	średnia absorbancja mean absorbance	liczba roślin no of plants	średnia absorbancja mean absorbance	liczba roślin no of plants			
Linia L-9 (O)***	0,106	69	—	0	1 : 0 (69 : 0)		
Wiślica (P)***	—	0	3,390	50	0 : 1 (0 : 50)		
F _{1(OxP)}	0,113	91	0,984	1	1 : 0 (92 : 0)		
F _{1(PxO)}	0,127	88	0,799	1	1 : 0 (89 : 0)		
BC _{1(OxP)} O	0,108	96	0,927	2	1 : 0 (98 : 0)		
BC _{1(PxO)} O	0,156	95	—	0	1 : 0 (95 : 0)		
BC _{1(OxP)} P	0,134	55	1,206	65	1 : 1 (60 : 60)	0,8333	0,3767
BC _{1(PxO)} P	0,169	71	1,375	57	1 : 1 (64 : 64)	1,5313	0,2159
F _{2(OxP)}	0,116	85	1,142	35	3 : 1 (90 : 30)	1,1111	0,2983
F _{2(PxO)}	0,098	81	0,816	35	3 : 1 (87 : 29)	1,6552	0,1983

* Oczekiwana proporcja odpornych i podatnych fenotypów przy założeniu, że cecha jest uwarunkowana działaniem jednego genu dominującego; Expected ratio of resistant and susceptible phenotypes in case of character which is determined by a single dominant gene

** Różnice między wartościami obserwowanymi a oczekiwanymi są statystycznie istotne przy p≤0,05; Differences between the observed and expected ratios are statistically significant at p≤0,05

*** O — rodzic odporny — resistant parent, P — rodzic podatny — susceptible parent

Podobne wyniki dotyczące dziedziczenia odporności tytoniu na TSWV uzyskano dla odmiany Polalta (Moon i Nicholson, 2007), podczas gdy wcześniejsze badania (Kennedy i Nielsen, 1993) wykazały, że za odporność odmiany Polalta odpowiadają dwa geny. Pojedynczy dominujący model odporności na TSWV stwierdzono również w odpornych

genotypach pomidora, zawierających gen *Sw-5* (Stevens i in., 1992) i u papryki (*Tsw*) (Boiteux i de Avila, 1994).

Nieco mniejsza od oczekiwanej liczba roślin odpornych w krzyżówkach testowych linii L-9 może być spowodowana nieregularną ekspresją lub eliminacją genu odporności, ujawniającą się zwłaszcza w genotypach heterozygotycznych pod względem cechy odporności.

Typowym wizualnym objawem odporności roślin były koncentryczne nekrotyczne plamy świadczące o nadwrażliwości. U niektórych roślin należących do genotypów odpornych oraz krzyżówek testowych, objawy porażenia systemicznego rozwijały się później i z mniejszym natężeniem, a zawartość wirusa mierzona wartością odczytanej absorbancji była niższa, niż w kontrolnej odmianie podatnej Wiślica (tab. 1). Podczas studiów nad przemieszczaniem się i dystrybucją TSWV w roślinach rodzaju *Capsicum* stwierdzono, że rozprzestrzenianie się wirusa z miejsc inokulacji jest wolniejsze w przypadku odpornych, niż w przypadku podatnych roślin, a odporność typu nadwrażliwości może osłabiać mechanizm transportu TSWV na duże odległości (Soler i in., 1999).

Linia L-9 stanowi wartościowy materiał wyjściowy dla dalszej hodowli odmian tytoniu, charakteryzujących się dobrymi cechami jakościowymi i odpornością na TSWV.

WNIOSKI

1. Linia hodowlana L-9 charakteryzuje się odpornością na porażenie wirusem brązowej plamistości pomidora, uwarunkowaną pojedynczym genem dominującym.
2. Dominujący sposób dziedziczenia się cechy odporności pozwala na wykorzystanie L-9 w praktyce zarówno jako czystej linii jak i komponenta ojcowskiego oraz matecznego w mieszańcach F_1 tytoniu.

LITERATURA

- Ahuja M. R. 1998. Genetic tumors in *Nicotiana* and other plants. *The Quarterly Review of Biology*. 73 (4): 439 — 459.
- Boiteux L. S., de Avila A. C. 1994. Inheritance of a resistance specific to tomato spotted wilt *tospovirus* in *Capsicum chinense* 'PI-159236'. *Euphytica* 75: 139 — 142.
- Francki R. I. B., Fauquet C. M., Knudson D. D., Brown F. 1991. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol. Suppl.* 2:1 — 450.
- Gajos Z. 1981. Przeniesienie odporności na wirus brązowej plamistości pomidora (Tomato Spotted Wilt Virus) z *Nicotiana glauca* Link et Otto do tytoniu szlachetnego poprzez skrzyżowanie obu gatunków. *Biul. CLPT* 1-2: 3 — 24.
- Gajos Z. 1988. Polalta — odmiana tytoniu odporna na wirus brązowej plamistości pomidora (TSWV) i czarną zgniliznę korzeni (*Thielaviopsis basicola* Ferr.). *Biul. CLPT* 1-4: 7 — 25.
- Jankowski F. 1980. Źródła odporności na TSWV (*Lycopersicon virus 3*) u dzikich gatunków rodzaju *Nicotiana*. *Biul. CLPT* 1-2:21 — 29.
- Jenser G., Szenasi A. 2004. Review of the biology and vector capacity of *Thrips tabaci* Lindeman (*Thysanoptera: Thripidae*). *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.*, 39(1-3): 137 — 155.
- Kamińska M., Korbin M. 1993. Wirus brązowej plamistości pomidora – występowanie i wykrywalność. Materiały z Sympozjum „Biotyczne środowisko uprawne a zagrożenie chorobowe roślin”, Olsztyn, Akademia Rolniczo-Techniczna, 7-9 września.

- Kennedy B. S., Nielsen M. T. 1993. Characterization of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in the tobacco cultivar 'Polalta'. (Abstr.) *Phytopathology* 83 (12): 1420.
- Laskowska D., Berbec A. 2006. Resistance to Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) in *Nicotiana glauca* and *N. sanderae* and in hybrids between *N. tabacum* and *N. glauca*. *Plant Breeding and Seed Science* 54: 91 — 100.
- Lista odmian roślin rolniczych. 2002. COBORU, Słupia Wielka.
- Marchoux G. 1990. La transmission de virus par *Frankliniella occidentalis* et autres thrips. *Phytoma* 422: 40 — 45.
- Moon H., Nicholson J. S. 2007. AFLP and SCAR Markers Linked to *Tomato Spotted Wilt Virus* Resistance in Tobacco. *Crop Sci.* 47: 1887 — 1894.
- Mumford R. A., Barker I., Wood K. R. 1996. The biology of the tospoviruses. *Ann. Appl. Biol.* 128: 159 — 183.
- Parella G., Gognalons P., Gebre-Selassie K., Vovlas C., Marchoux G. 2003. An update of the host range of tomato spotted wilt virus. *Journal of Plant Pathology* 85 (4, Special issue): 227 — 264.
- Smith H. 1988. The inheritance of genetic tumors in *Nicotiana* hybrids. *The Journal of Heredity.* 79 (4): 277 — 283.
- Soler S., Diez M. J., Rosello S., Nuez F. 1999. Movement and distribution of tomato spotted wilt virus in resistant and susceptible accessions of *Capsicum* spp. *Can. J. Plant Pathology* 21: 317 — 325.
- Stevens M. R., Scott S. J., Gergerich R. C. 1992. Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica* 59: 9 — 17.
- Tsakiridis J. P., Gooding G. V. 1972. Tomato spotted wilt virus in Greece. *Phytopatologia Mediterranea* 11 (1): 42 — 47.
- Ullman D. E., Sherwood J. L., German T. L. 1997. Thrips as vectors of plant pathogens. In: *Thrips as Crop Pests* (Lewis T. L., ed.). London: CAB International: 539 — 565.
- Zawirska I. 1979. Studia nad wciornastkiem tytoniowcem (*Thrips tabaci* Lind.) i jego rolę w przenoszeniu brązowej plamistości pomidora (TSWV) na tytoniu. *Materiały XIX Sesji Naukowej IOR, Poznań*: 267 — 278.