

Anna Depta, Magdalena Kawka, Karolina Kursa, Teresa Doroszevska

*Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach*

NOWOCZESNE METODY I TECHNIKI W ULEPSZANIU GENOTYPÓW TYTONIU DLA PRODUKCJI ROLNICZEJ I POPRAWY JAKOŚCI SUROWCA*

Wstęp

Tytoń uprawny stanowi jedną z ważniejszych dla człowieka roślin przemysłowych. Głównym celem prac hodowlanych jest dostarczenie rolnikom odpornych odmian, zapewniających stabilne plonowanie i tym samym decydujących o opłacalności produkcji, a dla przemysłu – surowca o dobrych cechach jakościowych. Nowe odmiany tytoniu z jednej strony powinny cechować się odpornością na patogeny, szczególnie na te, których zwalczanie jest utrudnione lub kosztowne, z drugiej zaś surowiec z nich otrzymany powinien odznaczać się odpowiednimi właściwościami technologicznymi ważnymi z punktu widzenia przemysłu tytoniowego. Obecnie prace nad ulepszaniem genotypów tytoniu łączą metody tradycyjnej hodowli z metodami biotechnologicznymi, np. zastosowaniem kultur *in vitro*, czy technikami biologii molekularnej, co znacznie skraca i ułatwia proces hodowlany. Tytoń jako roślina modelowa jest również obiektem wielu badań z zakresu genetyki, biologii molekularnej i biotechnologii, a uzyskane wyniki mają znaczący wkład w rozwój tych dziedzin nauki. W poniższym rozdziale zostały omówione zarówno metody i techniki znane i stosowane od wielu lat, jak również te najnowsze, które zrewolucjonizowały hodowlę i genetykę roślin.

Bariery krzyżowalności w mieszańcach międzygatunkowych/przełamywanie nieżywotności form mieszańcowych

Wykorzystanie gatunków oddalonych w hodowli daje szansę transferu wielu korzystnych genów, warunkujących lepszy plon lub odporność na choroby i szkodniki. Niestety, krzyżowanie międzygatunkowe wiąże się z wieloma trudnościami. Wraz z rozwojem nauki zwiększają się możliwości przełamywania barier krzyżowalności, do których należą niezgodność krzyżówkowa, śmiertelność oraz bezpłodność mieszańców.

Niezgodność krzyżówkowa, czyli niemożność uzyskania nasion mieszańcowych, może być spowodowana wieloma czynnikami. Jako pierwszą przyczynę wymienia się

*Opracowanie wykonano w ramach zadania 3.5 w programie wieloletnim IUNG-PIB

trudność dotarcia łagiewki pyłkowej do zalążni. Może być ona spowodowana różnicą w długości słupka pomiędzy gatunkiem maticznym i ojcowskim, fizjologiczną inhibicją wzrostu łagiewki pyłkowej lub mechanicznymi trudnościami w penetracji łagiewki przez tkankę słupka. Inhibicja fizjologiczna, określana jako tzw. niezgodność gametofityczna, jest warunkowana genetycznie (149), natomiast inhibicja mechaniczna jest spowodowana różnicami w wielkości komórek gatunków rodzicielskich. Dotarcie łagiewki do zalążni nie gwarantuje jeszcze sukcesu, gdyż gamety żeńska i męska nie zawsze się łączą ze sobą. Wiąże się to z podziałami komórek ośrodka bez utworzenia zarodka i bielma, a w konsekwencji niewytworzenie nasion lub utworzenie diploidalnego bielma i powstanie nasion bez zarodka. Zjawiskiem spotykanym przy krzyżowaniu z udziałem dzikich gatunków rodzaju *Nicotiana* jest powstawanie haploidalnych lub diploidalnych roślin typu maticznego lub ojcowskiego, spowodowane podziałami komórkowymi komórki jajowej lub jądra plemnikowego w woreczku zalążkowym. Haploidy maticzne uzyskano w krzyżówkach *Nicotiana tabacum* × *N. africana* (26), natomiast haploidy typu androgenicznego powstały w krzyżówce *N. tabacum* × *N. gossei* (27). Przyczyną niezgodności krzyżówkowej może być również nieprzeżywalność zarodka i w konsekwencji nieżywotne nasiona. Zahamowanie rozwoju zarodka tłumaczy się niezgodnością między maticznym bielmem i obcym zarodkiem.

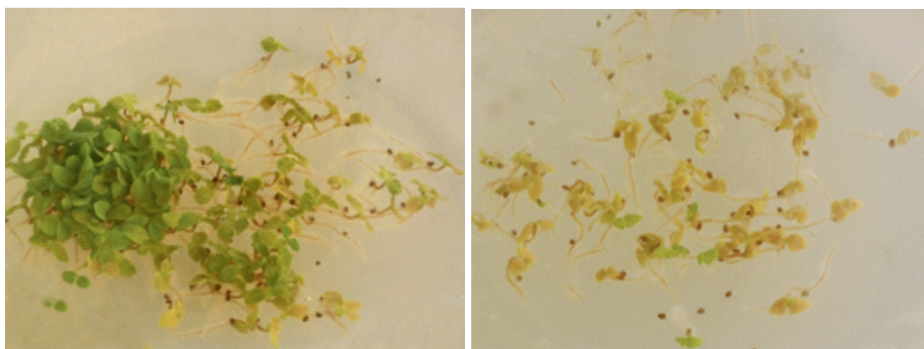
Sposobami na przełamanie tego typu niezgodności są: odpowiedni dobór gatunków i odmian do krzyżowań, nacięcie szyjki słupka (173) oraz zastosowanie tzw. pyłku mentora. Ostatnia metoda, opisana przez P a n d e y w roku 1977 (149), polega na zmieszaniu zgodnego pyłku z niezgodnym pyłkiem właściwym i naniesienie ich na znamię słupka. Pyłek-mentor poddawany jest wcześniej promieniom jonizującym, co pozwala zniszczyć jego jądra generatywne, ale nie niszczy zdolności kiełkowania i tworzenia łagiewki pyłkowej, która dostarcza substancji stymulujących dla wzrostu łagiewki pyłku właściwego. Uzyskanie żywotnych nasion w krzyżówkach *N. tabacum* × *N. rosulata* i *N. tabacum* × *N. debneyi* było możliwe na drodze sztucznego zapylenia wyciętych zalążków i hodowli zapłodnionych zalążków w warunkach *in vitro* (177). W momencie wystąpienia barier o charakterze zygocycznym zapłodnienie *in vitro* może okazać się nieskuteczne. Kolejnym sposobem mającym na celu poprawę żywotności i liczby nasion jest zastosowanie różnych związków chemicznych, jak na przykład kwas giberelinowy (120). W celu zapobieżenia abscysji, opadaniu kwiatów i zwiększeniu liczby nasion, można zastosować 5% mieszaninę IAA w lanolinie na szypułki kwiatowe (31) lub przeprowadzić wielokrotne zapylenie tych samych kwiatów.

W latach 70. opracowano metodę fuzji protoplastów, czyli łączenia ze sobą komórek somatycznych. Opisana przez G a m b o r g a i W e t t e r a w 1975 roku (75) metodyka obejmowała trzy etapy: izolację protoplastów na drodze enzymatycznego rozkładu ścian komórkowych, łączenie protoplastów w obecności glikolu polietylenu oraz selektywną hodowlę produktów fuzji. Użycie odpowiedniej

pożywki pozwala odróżnić kalus form mieszańcowych od kalusa form rodzicielskich. Pierwszym międzygatunkowym mieszańcem w rodzaju *Nicotiana* uzyskanym na drodze fuzji był *N. langsdorfii* × *N. tabacum* (32). Prace nad izolacją i fuzją protoplastów tytoniu prowadzono również w IUNG w Puławach z wykorzystaniem dwóch metod (144, 145). Pomyślny przebieg izolacji, łączenia protoplastów i regeneracji roślin napotykał jednak dalsze trudności związane z prowadzeniem wydajnej i szybkiej metody selekcji mieszańców somatycznych. Poza tym metoda fuzji protoplastów pozwalała obejść bariery krzyżowalności na drodze gametycznej, ale nie zmniejszała trudności łączenia genomów krzyżowanych gatunków.

Nieprzeżywalność mieszańców, czyli zamieranie roślin w fazie siewki lub na dalszym etapie rozwoju, może być spowodowane somatyczną niestałością chromosomów (133). Nieregularne podziały mitotyczne i inne przejawy niestałości chromosomowej we wczesnych stadiach rozwoju zarodkowego prowadzą do utworzenia różnych, często niezbalansowanych genotypów i, co za tym idzie, pojawianie się w F_1 zróżnicowanych, często nieprzeżywających fenotypów. Nieżywotność mieszańców została podzielona na cztery typy w oparciu o objawy (193):

- Typ I – brązowienie wierzchołka pędu i korzenia,
- Typ II – brązowienie liścieni i korzeni (rys. 1),
- Typ III – żółknięcie liści,
- Typ IV – tworzenie wielu pędów.



Rys. 1. Nieżywotność typu II w mieszańcach międzygatunkowych *N. tabacum* ‘VAM’ × *N. africana* (a) oraz *N. tabacum* ‘Wiślica’ × *N. africana* (b)

Źródło: fot. A. Depta, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB.

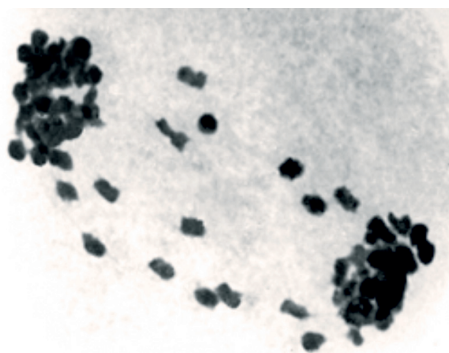
Badania wskazują, że co najmniej typ II i III związany jest z programowaną śmiercią komórki, czyli apoptozą, której towarzyszą kondensacja chromatyny, fragmentacja jądra i wewnątrzjądrowa fragmentacja DNA. Te obserwacje wskazują, że nieżywotność mieszańców jest kontrolowana genetycznie, w wyniku interakcji między genomami oraz, że czynniki cytoplazmatyczne nie biorą w tym udziału. W rodzaju *Nicotiana* sekcji *Suaveolentes*, co najmniej dziewięć gatunków (*N. africana*, *N. debneyi*, *N. excelsior*, *N. goodspeedii*, *N. gossei*, *N. maritima*, *N. megalosiphon*, *N. suaveolens* i *N. velutina*) tworzy nieżywotne mieszańce w typie II po krzyżowaniu z tytoniem uprawnym (128, 175, 192).

Analiza monosomiczna oraz wykorzystanie metod molekularnych pozwoliły stwierdzić, że za letalność mieszańców *N. tabacum* i *N. debneyi* odpowiada pojedynczy dominujący gen (*Hybrid Lethality A1*; HLA1), pochodzący od dzikiego gatunku, który wchodzi w interakcje z genem lub genami na chromosomie Q u *N. tabacum*. W celu określenia, który subgenom *N. tabacum* jest odpowiedzialny za letalność mieszańców, wykonano dwie krzyżówki pomiędzy *N. debneyi* × *N. sylvestris* oraz *N. debneyi* × *N. tomentosiformis*. We wszystkich przypadkach wykonano krzyżówki zwrotne. Mieszańce z *N. sylvestris* zamierały na etapie siewki, a obserwacje mikroskopowe i cytometryczne wskazywały na proces apoptozy. Mieszańce z *N. tomentosiformis* były żywotne i nie zaobserwowano żadnych zmian w genomie. Świadczy to jednoznacznie o obecności genów letalności w subgenomie S *N. tabacum*. W rodzaju *Nicotiana* mogą występować inne kombinacje genowe prowadzące do zamierania mieszańców. Przykładem reakcji w typie III jest mieszańiec *N. tabacum* i *N. repanda*. W tym przypadku krzyżowanie z przodkami tytoniu, czyli *N. sylvestris* i *N. tomentosiformis*, wskazuje na obecność genów letalności w subgenomie T (93, 174).

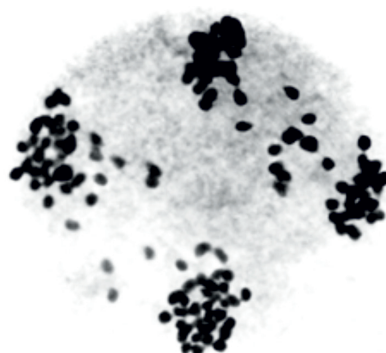
Do sposobów przełamania tego typu odporności należy m.in. wysiew jak największej liczby nasion roślin mieszańcowych oraz optymalizacja warunków środowiskowych dla wzrostu i rozwoju młodych roślin. Zastosowanie hodowli tkankowej pozwoliło uzyskać żywotne rośliny mieszańcowe, u których następowała degeneracja systemu korzeniowego na etapie siewki. Do tego typu mieszańców należą m.in.: *N. occidentalis* × *N. tabacum* (176), *N. tabacum* × *N. debneyi* (177), *N. suaveolens* × *N. tabacum* (119). Żywotne rośliny mieszańcowe *N. tabacum* × *N. africana* uzyskano stosując kulturę *in vitro* liścieni (60). Kolejną metodę zastosowali Reed i Collins w 1978 (157), dla mieszańców *N. stoughtonii* × *N. tabacum*, *N. nesophila* × *N. tabacum* i *N. repanda* × *N. tabacum*. Polegała ona na przeniesieniu w sześć dni po zapyleniu zapłodnionych zalążków aseptycznie usuniętych z zalążni.

Sposobem utrzymania żywotnych roślin mieszańcowych może być przetrzymywanie ich w warunkach podwyższonej temperatury. Badania wskazały, że optymalna jest temperatura 34°C. Obniżenie temperatury do 28°C inicjuje zamieranie roślin. Odwrotnie zachowują się rośliny wyjściowe, brane do krzyżówek, dla których najlepsza temperatura to 28°C.

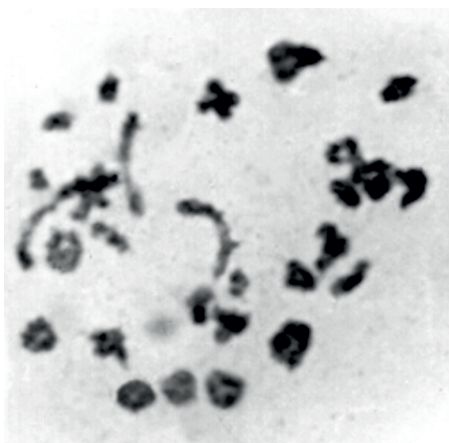
Bezpłodność mieszańców międzygatunkowych stanowi duży problem w hodowli, gdyż niemożliwe jest uzyskanie nasion z samozapylenia, jak również wykonanie krzyżówek wstecznych. Dotyczy to niemal wszystkich mieszańców w rodzaju *Nicotiana*, w tym krzyżówek z *N. tabacum*. Wyjątkiem są mieszańce *N. alata* × *N. langsdorfii* oraz *N. alata* × *N. amplexicaulis* (84). Bezpłodność międzygatunkowych mieszańców *Nicotiana* wywołana jest głównie strukturalnymi różnicami w chromosomach, co uniemożliwia ich normalną koniugację oraz różnicami w liczbach chromosomów u gatunków biorących udział w powstaniu mieszańca. Prowadzi to do przypadkowego rozchodzenia się univalentów podczas podziałów mejotycznych i tworzenia niezbalansowanych chromosomów i niefunkcjonalnych gamet (rys. 2).



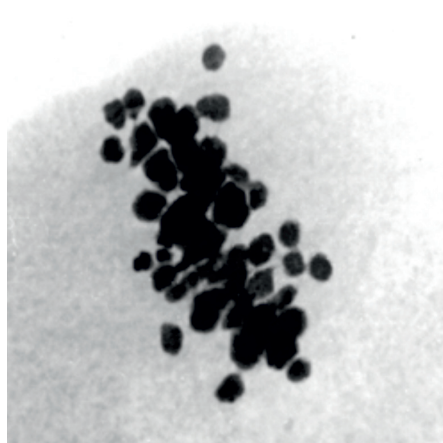
a) Anafaza I KMP roślin pokolenia BC₂ – chromosomy opóźnione



b) Anafaza II KMP roślin pokolenia BC₂ – chromosomy opóźnione



c) Diakineza w KMP roślin pokolenia BC₂F₂ – 24 bivalenty i 4 uniwalenty



d) Metafaza I KMP roślin pokolenia BC₂ – 15 uniwalentów poza płytką metafazową

Rys. 2. Zaburzenia mejozy obserwowane u mieszańców *N. tabacum* × *N. africana*.

Źródło: Doroszewska, 2004 (58).

Inne nieregularne procesy, które przyczyniają się do zaburzeń w normalnym rozchodzeniu się chromosomów, to pęknięcia chromosomów, mostki chromatynowe i powstawanie chromosomów w równikowej strefie mejozytu. Takie zaburzenia obserwowano wśród mieszańców międzygatunkowych *N. tabacum* × *N. africana* (54).

Istnieje kilka metod pozwalających przełamać problem bezpłodności mieszańców. Należą do nich wykorzystanie niezredukowanych gamet lub podwojenie liczby chromosomów somatycznych międzygatunkowego mieszańca F₁ za pomocą tzw. trucizn mitotycznych. Są to związki chemiczne, które zakłócają przebieg tworzenia się wrzeciona kariokinetycznego podczas podziału komórki, w wyniku czego następuje podział chromosomów, po którym nie następuje rozjeżdżenie się siostrzanych chromatyd do biegunów. Podzielone chromosomy zostają w płaszczyźnie równikowej komórki i w telofazie są otoczone wspólną błoną jądrową. Usunięcie w tym momencie związku antymito-

tycznego, poprzez płukanie, pozwala komórce na prawidłowy podział. Najczęściej używanym w tym celu związkim chemicznym jest kolchicina, aplikowana podczas kiełkowania nasion bądź rozwoju stożków wzrostu (12).

Druga grupa metod poliploidyacyjnych wykorzystuje komórki poliploidalne, naturalnie występujące w roślinie lub ich indukcję w warunkach *in vitro* poprzez zastosowanie hormonów wzrostowych, czy wydłużenie czasu prowadzenia kultury (59). W ten sposób uzyskano amfidiploidalne mieszańce *N. tabacum* × *N. africana*, które charakteryzowały się wysoką płodnością (55), warunkującą ich dalsze wykorzystanie w hodowli odpornościowej. Komórki poliploidalne występują w części korowej i walca osiowego łodygi i korzeni. Powstają głównie w procesie endomitozy. Można je pobudzić do podziałów i tworzenia kalusa poprzez zranienie lub zastosowanie hormonów wzrostowych. Spontaniczne amfidiploidy mogą powstać na drodze zapłodnienia niezredukowanej komórki jajowej przez niezredukowane jądro plemnikowe lub przez spontaniczne podwojenie chromosomów we wczesnych fazach rozwoju embrionalnego u mieszańca F_1 . Najbardziej skuteczną metodą uzyskania płodnych mieszańców międzygatunkowych jest krzyżowanie tetraploidalnych form obu gatunków rodzicielskich lub krzyżowanie formy diploidalnej z tetraploidalną, prowadzące do otrzymania częściowo płodnego pokolenia seskwidiploidalnego (55).

Innym sposobem przełamania barier krzyżowalności pomiędzy gatunkiem uprawnym i dzikim jest zastosowanie krzyżowania pomostowego poprzez gatunek trzeci, który krzyżuje się zarówno z gatunkiem uprawnym, jak i dzikim. Po raz pierwszy w roku 1967 zastosował tę metodę Burk (29). Krzyżował on *N. repanda* z *N. tabacum* w celu przeniesienia odporności na mozaikę od *N. repanda*. Gatunkiem pomostowym był *N. sylvestris*. Inną kombinację pomostową zastosował Bolsonov w roku 1971 (24) w celu przeniesienia odporności na mączniaka rzekomego z *N. exigua* do *N. tabacum*. W pierwszym etapie skrzyżował on *N. exigua* z *N. rustica*, a następnie tak otrzymanego mieszańca krzyżował z *N. tabacum*.

Uzyskanie płodnych i żywotnych form mieszańcowych jest bardzo ważnym etapem na drodze wykorzystania pożądanych cech gatunków oddalonych. Jednakże introgresja czynników odporności z gatunków dzikich do genomu *N. tabacum* wiąże się z trudnościami w rozbiciu grup sprzężeń przenoszonych na dużych odcinkach materiału genetycznego, warunkującego szereg cech niekorzystnych pod względem gospodarczym. Powoduje to, że mimo istniejącego potencjału czynników odporności w rodzaju *Nicotiana*, niewiele jest odmian uprawnych niosących geny odporności od dzikich gatunków.

Tworzenie haploidów i podwojonych haploidów

Połączenie tradycyjnej hodowli tytoniu z metodami biotechnologicznymi, np. zastosowaniem kultur *in vitro* jest ważne z praktycznego punktu widzenia, ponieważ pozwala znacznie przyspieszyć proces hodowlany. Skrócenie czasu potrzebnego na

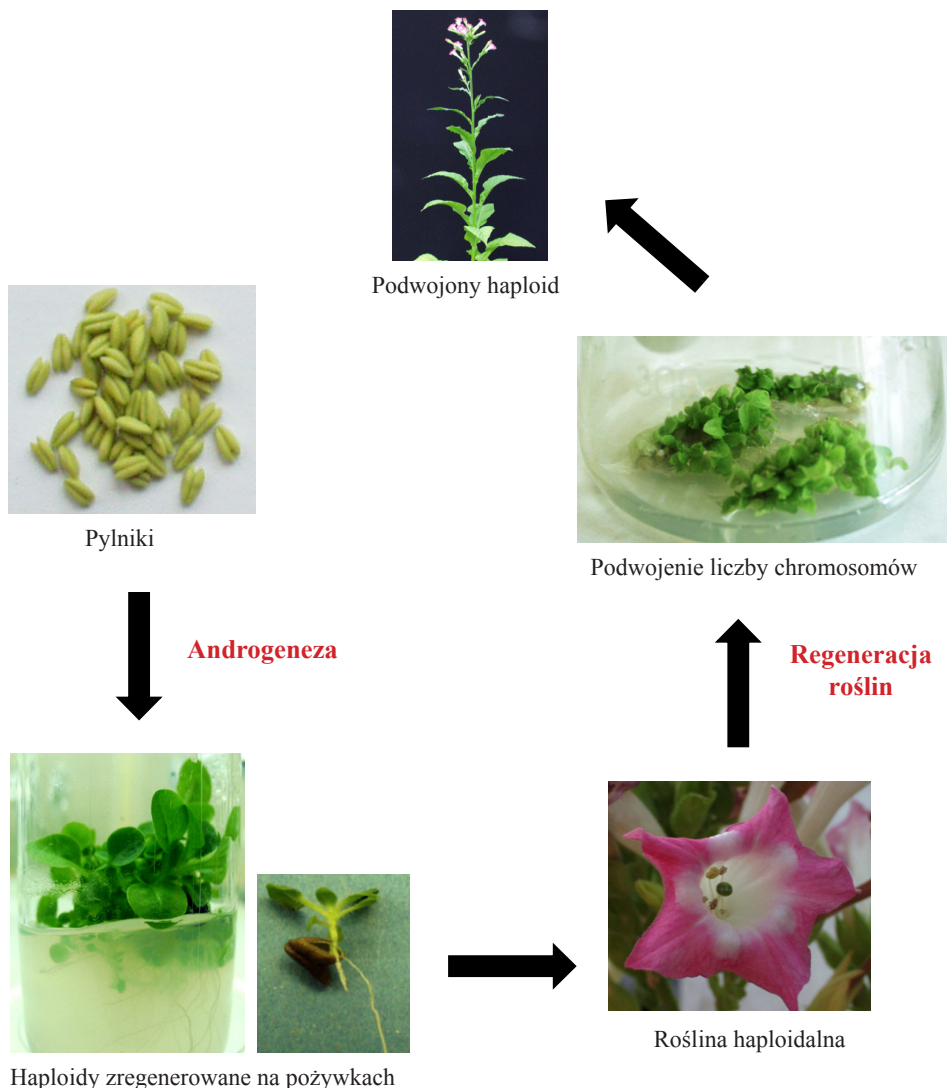
wyhodowanie nowej odmiany można osiągnąć przez otrzymanie roślin haploidalnych z mieszańcowego pokolenia F_1 , czyli roślin z gametyczną liczbą chromosomów. Dzięki temu selekcja roślin pod względem pożądaney cechy jest ułatwiona, ponieważ właściwości kodowane przez allele recesywne zostają ujawnione w fenotypie. Po raz pierwszy rośliny haploidalne otrzymała w 1921 roku D. B e r g n e r (158) dla gatunku *Datura stramonium*, natomiast pierwsze doniesienia o uzyskaniu haploidalnych roślin *N. tabacum* przez C l a u s e n ' a i M a n n ' a (153) pochodzą z 1924 roku. Znaczne przyspieszenie w tym względzie nastąpiło w wyniku opracowania metod otrzymywania haploidów w warunkach laboratoryjnych np. z wykorzystaniem kultury *in vitro* pylników. Pierwsze takie rośliny *N. tabacum* otrzymał B o u r g i n i N i t s c h w 1967 roku (153). Najwięcej haploidalnych tkanek czy roślin powstających bądź z spontanicznie, bądź z wykorzystaniem różnych technik do ich indukcji, zaobserwowano w rodzinie psiankowatych (*Solanaceae*), do której m.in. należy tytoń, ale także u kapustnych (*Brassicaceae*), roślin zbożowych (*Cereales*) oraz traw (*Gramineae*) (126).

Haploidy mogą powstawać spontanicznie bądź w wyniku indukcji z wykorzystaniem różnych technik haploidyacji. Techniki te opierają się na takich procesach biologicznych jak androgeniza *in vitro*, gynogeneza *in vitro*, apomiksja czy eliminacja chromosomów. Dla wielu gatunków roślin charakterystyczny jest tylko jeden z procesów, natomiast dla *N. tabacum* wszystkie wymienione metody okazały się skuteczne w otrzymywaniu roślin haploidalnych (153). Najpowszechniej wykorzystywaną techniką jest **androgeniza *in vitro***. Jest to proces, w czasie którego haploidalne mikrospory (komórki macierzyste pyłku) zmieniają kierunek swojego rozwoju – generatywnego, a więc prowadzącego do tworzenia ziaren pyłkowych, na nowy wegetatywny, który prowadzi do powstania zarodków, a następnie roślin. Całe niedojrzałe pylniki lub izolowane mikrospory są wykładane na pożywkę wzbogaconą odpowiednimi fitohormonami, które powodują zmianę kierunku rozwoju mikrospor i powstanie zarodków haploidalnych (rys. 3). Można wyróżnić dwa typy rozwoju mikrospory w roślinę haploidalną: embriogenezę bezpośrednią przez stadium wielojądrowej lub wielokomórkowej mikrospory, aż do otrzymania pędu oraz embriogenezę pośrednią ze stadium formowania się kalusa. Oprócz roślin haploidalnych mogą powstawać także formy diploidalne, poliploidalne, miksploidalne oraz formy o garniturze chromosomowym niespotykanym w przyrodzie ani niepowstające na drodze krzyżowania, które także mogą być przydatne w hodowli nowych odmian. To właśnie dzięki androgenizie wyhodowano rośliny, które posłużyły do wyprowadzenia wielu nowych odmian tytoniu. Skuteczna androgeniza wymaga zastosowania jednego lub kilku bodźców zewnętrznych, tzw. czynników stresowych, którymi można oddziaływać na całe rośliny, pojedyncze kwiaty, pylniki lub izolowane mikrospory (179). O efektywności powstawania roślin z zarodków mikrosporowych decyduje wiele czynników genetycznych, ale także chemiczne i fizyczne właściwości samej kultury *in vitro*. Do najważniejszych z nich należą:

- kondycja rośliny, która jest dawcą eksplantatów (stan fizjologiczny i wiek rośliny oraz warunki wzrostu takie jak: wilgotność, nawożenie, oświetlenie, temperatura);
- gatunek rośliny, jej ploidalność, genotyp w obrębie gatunku, np. odmiana lub linia hodowlana;
- sposób traktowania wstępnego, czyli działanie różnymi czynnikami chemicznymi lub fizycznymi na całą roślinę lub pylniki, celem zaindukowania androgenezy (rodzaj i czas oddziaływania czynnika stresowego);
- sposób prowadzenia kultury (całe pylniki, wyizolowane mikrospory, metody łączone, stadia rozwojowe pylników lub mikrospor, sposób uwalniania mikrospor);
- pożywka (skład, konsystencja, wartość osmotyczna);
- warunki kultury *in vitro* (temperatura, światło) (122, 123).

Najłatwiej wywołać androgenezę w pylnikach gatunków z rodziny *Solanaceae*. Do tej pory przeprowadzono liczne badania nad ustaleniem optymalnych warunków androgenezy *in vitro* u *Nicotiana* dotyczące m.in. składu pożywek, faz rozwojowych mikrospor czy warunków wzrostu. W przypadku pożywek wymagany skład jest bardzo prosty (cukier, sole mineralne), natomiast kluczowa okazała się dostępność żelaza, którego brak skutecznie zatrzymuje embriogenezę w fazie globularnej. Hormony wzrostowe są koniecznym stymulatorem podziałów komórkowych w pyłku większości roślin, natomiast w przypadku tytoniu zastosowanie hormonów takich jak auksyny, cytokiny czy gibereliny nie wpływa na zwiększenie liczby zaindukowanych mikrospor, a w wyższych stężeniach związku te mogą działać nawet jako inhibitory. Poza tym, dodanie do pożywki węgla aktywowanego działa pozytywnie, prawdopodobnie poprzez absorpcję nadmiaru substancji wzrostowych syntetyzowanych przez rozwijające się organy roślin oraz absorpcję różnych toksycznych substancji z pożywki hamujących embriogenezę. Niezwykle ważne jest rozpoznanie właściwej fazy rozwojowej mikrospor, w której może dokonać się inicjacja rozwoju zarodków i, jak ustalono, jest to stadium bezpośrednio przed, w trakcie lub bezpośrednio po pierwszym podziale mitotycznym (mikrospora jednojądrowa zwakuolizowana, dwukomórkowe ziarno pyłku). Jednak największy odsetek zaindukowanych pylników oraz największą liczbę zarodków uzyskanych z pojedynczego pylnika uzyskano, kiedy mikrospory były w późnej fazie jednojądrowej lub były w trakcie pierwszego podziału mitotycznego (10). Innymi czynnikami istotnie wpływającymi na embriogenezę u tytoniu są zastosowany fotoperiod podczas prowadzenia kultury *in vitro*, wiek rośliny, z której pobierano pąki oraz sposób traktowania wstępnego, np. niska lub wysoka temperatura czy zastosowane warunki anaerobowe (10). Mikrospory tytoniu pozytywnie reagują na stres ciepła, który powoduje m.in. dezintegrację cytoszkieletu, syntezę białek szoku cieplnego (ang. *heat shock proteins*, HSP) oraz na stres głodu, czyli brak w pożywce wstępnej przyswajalnych węglowodanów lub zastąpienie ich niemetalizowanym mannitolem. Powo-

duje to zmianę struktury chromatyny, pojawienie się białek HSP, odróżnicowanie plastydów i obniżenie poziomu syntezy RNA. Także umieszczenie mikrospor tytoniu w pożywce o podwyższonym pH (8,0-8,5) przez 4-6 dni skutecznie indukuje embriogenezę, ponieważ uniemożliwia wykorzystanie sacharozy znajdującej się w pożywce i tym samym indukuje stres głodu. Chemicznym czynnikiem stresowym może być kwas abscysynowy, który hamuje syntezę cząsteczek mRNA niezbędnych do rozwoju funkcjonalnego pyłku (126).



Rys. 3. Otrzymywanie roślin haploidalnych i podwojonych haploidów na drodze androgenезы *in vitro*.

Źródło: opracowanie i fot. A. Czubačka, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB.

Modyfikacją metody androgenezy z wykorzystaniem pylników jest technika, w której pylniki umieszcza się w odpowiednich pożywkach płynnych o wysokiej osmolarności, dzięki czemu są one stymulowane do uwalniania mikrospor. Technikę tę z dużym sukcesem zastosowano u *N. tabacum* (65). Androgenesa z wykorzystaniem kultury pylników jest metodą powszechnie stosowaną dla wielu różnych gatunków roślin, w tym także tytoniu, zwłaszcza w celach hodowlanych. Jej największą zaletą jest prostota, dzięki temu duża liczba pylników może zostać wyłożone na pożywkę, co z kolei pozwala ominąć problem dość niskiej wydajności otrzymywania haploidów z pojedynczych pylników. Jednakże dla badań z zakresu biologii komórki czy genetyki, obecność sporofitowej ściany pylnika otaczającej mikrospory może być problematyczna, dlatego częściej stosowana jest androgenesa z wykorzystaniem izolowanych mikrospor. Ponieważ zarówno składniki pożywki, jak i czynniki zewnętrzne działają bezpośrednio na izolowane mikrospory z pominięciem ścian pylnika, znacznie więcej mikrospor w optymalnych warunkach może zostać skutecznie zaindukowanych do rozwoju. Poza tym, można uniknąć regeneracji diploidalnych zarodków z tkanki somatycznej pylnika. I m a m u r a i i n. w roku 1982 (94), którzy prowadzili badania nad kulturami izolowanych mikrospor tytoniu odkryli, że pobudzenie do rozwoju embriogenetycznego może wystąpić bez wcześniejszego oddziaływania czynnikami stresowymi, czy to na całe rośliny, pąki czy pylniki, z których będą izolowane mikrospory. Komórki macierzyste pyłku były izolowane we wczesnej fazie dwujądrowej podczas mejozy i umieszczane w pożywce bez dodatku sacharozy, a po określonym czasie (5-7 dni) przenoszone na pożywkę zawierającą 2% sacharozę oraz 5 mM glutaminę. Stres spowodowany brakiem przyswajalnych węglowodanów w pierwszej pożywce powodował odróżnicowanie mikrospor i zmianę kierunku rozwoju.

Drugim sposobem uzyskiwania haploidów jest **gynogeneza**, czyli proces polegający na rozwoju roślin z niezapłodnionej komórki jajowej lub innych haploidalnych komórek woreczka zalążkowego. Czynniki, które decydują o jej skuteczności są podobne jak w przypadku androgenezy *in vitro*, czyli są to m.in.: gatunek, genotyp i kondycja rośliny dawcy, warunki prowadzenia kultury *in vitro*, stosowane czynniki stresowe czy fazy rozwojowe w jakich znajdują się zalążnie, zalążki i woreczki zalążkowe (195). Ten sposób otrzymywania roślin haploidalnych jest mniej powszechny w porównaniu z procesem androgenezy, głównie ze względu na trudności techniczne, np. podczas izolacji komórek jajowych czy określania stadium rozwojowego woreczków zalążkowych, podczas wykładania zalążni lub zalążków na pożywkę. Może jednak stanowić alternatywę w stosunku do innych metod, zwłaszcza dla tych gatunków, u których androgenesa nie powiodła się lub przebiegała z niską wydajnością oraz dla roślin męskosterylnych. Zwykle na pożywkę wykładane są zalążnie i zalążki lub całe zawiązki kwiatowe, natomiast bardzo rzadko wyizolowane komórki jajowe. Metoda ta nie jest powszechnie używana przede wszystkim ze względu na niską wydajność i dużą pracochłonność.

W przypadku otrzymywania roślin haploidalnych tytoniu, dla których skuteczna okazała się znacznie prostsza metoda androgenezy *in vitro*, gynogeneza jest rzadko stosowana.

Kolejnym sposobem uzyskiwania haploidów jest wykorzystywanie **apomiksji**. Proces apomiksji polega na rozwoju zarodków haploidalnych z komórek gametofitu o zredukowanej liczbie chromosomów, bez udziału zapłodnienia. Można wyróżnić kilka form apomiksji i są to: partenogeneza haploidalna, apogamia, semigamia, androgeneza i poliembrionia rzekoma. Najczęściej wykorzystywana jest partenogeneza haploidalna, czyli rozwój zarodka z haploidalnej, niezapłodnionej komórki jajowej, która została wcześniej zaindukowana (153). Czynnikiem, które indukują ten typ rozwoju zarodka są m.in.: pyłek o zmienionych właściwościach pod wpływem działania np. wysokiej temperatury czy promieniowania jonizującego, który traci zdolność do zapłodnienia komórki jajowej lub pyłek innego gatunku, rodzaju czy pyłek tego samego rodzaju, ale o zmienionej ploidalności, który nie ma zdolności do zapłodnienia. Rozwojowi zarodka towarzyszą różne zaburzenia, m.in. zahamowanie rozwoju bielma, dlatego rozwój, aż do stadium rośliny musi zachodzić na sztucznych pożywkach. Zjawisko partenogenezy haploidalnej wykorzystano m.in. do uzyskania roślin haploidalnych tytoniu poprzez zaindukowanie komórek jajowych napromieniowanym pyłkiem (148). Nielsen i Collins w roku 1989 (140) do otrzymania haploidów wykorzystali pyłek dzikiego gatunku tytoniu *N. africana*. Rośliny haploidalne, tzw. haploidy męskie, które wykiełkowały z nasion mieszańców powstałych ze skrzyżowania odmiany 'KY 17' i *N. africana*, różniły się od form mieszańcowych nie tylko liczbą chromosomów, ale także np. wigorem oraz kolorem łodygi. Formy mieszańcowe ze względu na niedostatecznie rozwinięty system korzeniowy po pewnym czasie zamierały.

Eliminacja chromosomów, jako kolejna metoda otrzymywania haploidów, może zachodzić zarówno w kulturach *in vitro* bardzo młodych zarodków mieszańcowych, jak i w tkankach somatycznych pod wpływem działania różnych czynników fizycznych i chemicznych. Zarodki mieszańcowe powstają przez zapylenie rośliny pyłkiem innego gatunku, np. pyłkiem formy dzikiej. W przypadku bardzo młodych zarodków mieszańcowych umieszczonych na sztucznych pożywkach w czasie pierwszych podziałów mitotycznych dochodzi do redukcji chromosomów formy dzikiej. Zarodek na dalszych etapach rozwoju posiada jedynie gametyczną liczbę chromosomów męskich. Redukcja liczby chromosomów może być skutkiem asynchronii w cyklach mitotycznych form rodzicielskich, nieprawidłowości w budowie wrzeciona kariokinetycznego lub zaburzeń systemu enzymatycznego (100). Eliminacje chromosomów z tkanki somatycznej można natomiast otrzymać przez stosowanie promieniowania jonizującego, czy przez dodanie do pożywki w odpowiednich stężeniach hormonów, herbicydów lub pochodnych aminokwasów (153).

Tak jak już wspomniano, rośliny haploidalne tytoniu wzbudzają powszechne zainteresowanie hodowców, ale nie tylko, ponieważ są także wykorzystywane w szeroko pojętych badaniach genetycznych. W hodowli z wykorzystaniem

haploidów zwraca się przede wszystkim uwagę na wybór jak najlepszych materiałów wyjściowych, opracowanie metod otrzymania jak największej liczby roślin haploidalnych w krótkim czasie, najlepiej przy niskim nakładzie kosztów oraz na odtworzenie płodności poprzez diploidyzację. Pomimo, że liczba zregenerowanych roślin haploidalnych jest zwykle bardzo mała przy dużym nakładzie pracy, to korzyści płynące z pozyskania nawet kilku roślin o pożądanym cechach, a potem wykorzystanie ich w dalszej hodowli, są ogromne. Należą do nich wszystkim skrócony czas hodowli przez możliwość uzyskania homozygot z heterozygotycznych rodziców w jednym pokoleniu oraz ułatwiona, wydajna selekcja pożądanym kombinacji genów z populacji mieszańcowych, ponieważ homozygoty nie wykazują dominacji i segregacji cech. W programach hodowlanych prowadzonych w IUNG-PIB można znaleźć wiele przykładów połączenia tradycyjnej hodowli tytoniu z metodami biotechnologicznymi, m.in. prace nad uzyskaniem odmian tytoniu łączących w sobie odporność na *Thielaviopsis basicola* pochodzącą od *N. glauca* oraz *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) pochodzącą od odmiany 'Polalta'. W wyniku prowadzonych badań uzyskano 24 odporne rośliny haploidalne z mieszańcowego pokolenia F₁ stosując haploidyzację na podłożu Nitsch and Nitsch z wykorzystaniem androgenezy *in vitro* (182).

W dziedzinie genetyki dzięki haploidom możliwe staje się ujawnienie, a potem zbadanie genów recesywnych, które normalnie w roślinach diploidalnych występują w układzie heterozygotycznym. Haploidy wykorzystywane są także w badaniach nad mapowaniem i analizą genomów, do identyfikacji *loci* cech ilościowych (QTL), w transformacji genetycznej, a także w hodowli nowych odmian z wykorzystaniem markerów genetycznych. Haploidy można także wykorzystać do analizy pochodzenia gatunków przez obserwowanie chromosomów w mejozie. Na podstawie obserwacji można np. stwierdzić, czy gatunek wyjściowy był autopoliploidalny czy allopoliploidalny (103). Poprzez krzyżowanie haploidów z roślinami o innej ploidalności otrzymujemy aneuhaploidy, których potem można użyć do badań chromosomów i genów. Rośliny haploidalne wykorzystywane są także w hodowli mutacyjnej np. w hodowli tytoniu odpornego na streptomycynę (127) oraz mogą służyć jako materiał wyjściowy do izolacji i fuzji protoplastów. M e l h e r s i L a b i b w roku 1974 (129) jako pierwsi wyizolowali i dokonali fuzji protoplastów pochodzących z dwóch bezchlorofilowych odmian *N. tabacum*.

Wyselekcjonowane rośliny haploidalne, które mają pożądanym cechy, ale są niepłodne, poddawane są procesowi **diploidyzacji**, czyli podwajania liczby chromosomów. Genotyp podwojonych haploidów (DH) jest taki sam jak genotyp haploidów, z których powstały a jednocześnie rośliny te są płodne, co jest ważne dla dalszych etapów hodowli. Opracowanie efektywnych metod produkcji stabilnych genetycznie, homozygotycznych linii podwojonych haploidów jest kluczowym elementem wykorzystania roślin haploidalnych w badaniach genetycznych czy programach hodowlanych. Linie te są cennymi roślinami rodzicielskimi

w krzyżowaniach mających na celu wprowadzenie nowej odmiany uprawnej. Diploidyzaacja może zachodzić spontanicznie, bądź z zastosowaniem związków chemicznych powodujących dezorganizację mikrotubul i uniemożliwiających rozdział chromosomów do komórek potomnych, np. kolchicyny. Kolchicynę można aplikować w trakcie rozwoju roślin matecznych, dodając do pożywek w kulturach zarodków *in vitro* lub na wierzchołki haploidalnych pędów wegetatywnych. Efektywność diploidyzaacji przez dodanie kolchicyny we wczesnym etapie kultury *in vitro* waha się w granicach od 83% do 91%, w zależności od gatunku i zastosowanego stężenia (126). Zwykle, otrzymywanie roślin DH przy użyciu kolchicyny daje bardzo dobre efekty. W przypadku *Nicotiana* skutecznym sposobem diploidyzaacji jest regeneracja pędów w kulturze *in vitro* na drodze spontanicznej poliploidyzaacji. Fragmenty walca osiowego łodygi dojrzałych roślin haploidalnych tytoniu są wykładane na pożywkę LS (118) z dodatkiem fitohormonów – kinetyny o stężeniu $2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ i IAA o stężeniu $2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ według L l o y d (119) (rys. 3). Skuteczną modyfikacją tej metody dającą możliwość uzyskania większej liczby podwojonych haploidów jest przechowywanie fragmentów łodyg w kulturach *in vitro* w ciemności przez 28 dni, a następnie pasaż eksplantatów na pożywkę zawierającą BAP (6-benzylaminopurynę) oraz 4-krotnie wyższą zawartość kinetyny (48). Stosując metodę regeneracji fragmentów łodyg otrzymano diploidyzaację wyselekcjonowanych genotypów haploidów uzyskanych z mieszańcowego pokolenia F_1 odmian ‘Polalta’ i ‘Wiślica’. Celem badań było otrzymanie linii podwojonych haploidów, niosących w sobie odporność na TSWV pochodzącą od odmiany ‘Polalta’, przy jednoczesnym braku morfologicznych deformacji liści, które zwykle występują po krzyżowaniu z innymi odmianami uprawnymi podatnymi na TSWV (112). Technikę tę wykorzystano także w badaniach nad uzyskaniem transgenicznych linii podwojonych haploidów tytoniu w kulturach *in vitro*, co znacznie skróciło czas uzyskania stabilnych linii. Diploidyzaacji poddawano formy haploidalne mieszańców powstałych ze skrzyżowania transgenicznych linii hodowlanych z formami nietransformowanymi, stosując dwie metody: kolchicynowanie oraz metodę regeneracji fragmentów łodyg. Wyniki badań wskazały na drugą z wymienionych metod jako bardziej wydajną w danych warunkach eksperymentu, a także wykazały brak występowania zakłóceń w procesie powstawania i dojrzewania mikrospor u transgenicznych linii DH, o czym świadczą prawidłowy przebieg mejozy oraz wysoka żywotność pyłku. Dzięki zastosowaniu tej metody możliwe było szybkie uzyskanie kolejnych pokoleń podwojonych haploidów i tym samym ocena ekspresji transgenu oraz zbadanie sposobu jego dziedziczenia (48).

Podstawową zaletą linii podwojonych haploidów (DH) jest ich kompletna homozygotyczność, co znacznie upraszcza ocenę fenotypową oraz odtworzona płodność. Linie DH mogą poprawić wydajność i szybkość metod tradycyjnej hodowli, które zwykle są czasochłonne i pracochłonne, a w połączeniu z selekcją opartą na markerach genetycznych znacznie skracają ten proces. Podwojone haploidy mają zastosowanie nie tylko w programach hodowlanych, ale także

w mapowaniu genetycznym, podstawowych badaniach genetycznych i molekularnych, w badaniach mutacyjnych i nad transformacją (39). Tytoń należy do roślin modelowych, dla których opracowano bardzo skuteczne metody otrzymywania haploidów i podwojonych haploidów wykorzystywanych w hodowli. Obecne badania skupiają się głównie na modyfikacjach istniejących już metod oraz na połączeniu istniejących technik z badaniami genetycznymi (10).

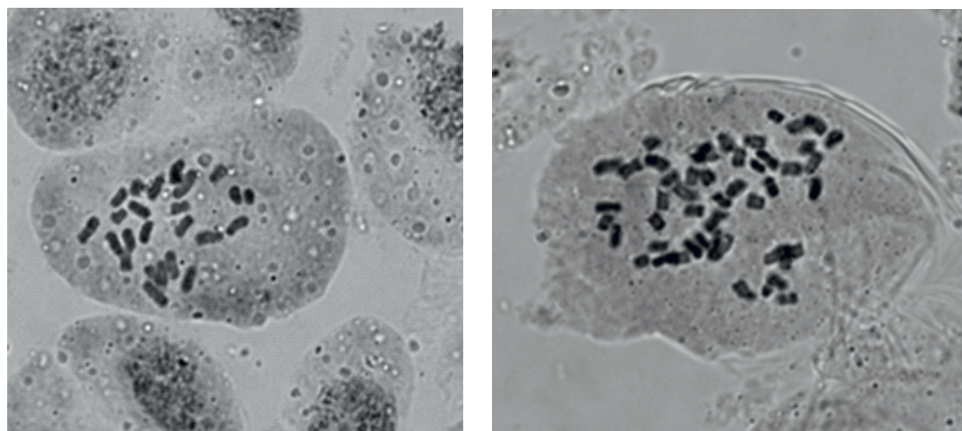
Możliwości oceny ploidalności – liczenie chromosomów i cytometria przepływowa

Badania cytologiczne i cytogenetyczne obejmują badanie chromosomów, czyli określanie ich liczby i struktury, obserwacje przebiegu mejozy, badanie żywotności pyłku i zdolności jego kiełkowania oraz określanie zawartości DNA jądrowego i wielkości genomu. Metody stosowane w badaniach chromosomów roślinnych można podzielić na proste, które nie wymagają kosztownej aparatury oraz zaawansowane, które łączą metody cytologiczne z technikami molekularnymi, np. hybrydyzacją *in situ*, czy takie, które wymagają specjalistycznej aparatury w postaci cytometru przepływowego.

Najprostszą metodą badania liczby i struktury chromosomów jest wykonywanie preparatów cytologicznych i przeprowadzanie obserwacji mikroskopowych. Poprawne wykonanie preparatu, czyli uzyskanie obrazu chromosomów, które są dobrze widoczne, nie nakładają się na siebie i są pozbawione cytoplazmy, jest kluczowe dla uzyskania satysfakcjonujących wyników. Cała procedura przygotowywania preparatów składa się z doboru odpowiedniego materiału w zależności od celu badania, utrwaleniu go, wykonaniu preparatu i wybarwieniu chromosomów. Jeśli badania dotyczą ustalania liczby chromosomów mitotycznych, najczęściej wykorzystywane są merystemy wierzchołkowe korzeni i pędów, a także młode pąki kwiatowe lub liście, jak również komórki pochodzące z hodowli *in vitro*. Do oceny mejozy najodpowiedniejsze są komórki macierzyste pyłku otrzymane z pylników. Pobrany materiał, w celu nagromadzenia komórek w stadium metafazy i skrócenia chromosomów, powinien być wstępnie traktowany wybranym środkiem chemicznym (8-hydroksychinolina, kolchicina, paradichlorobenzen, α -bromonaftalen) lub przetrzymywany na lodzie. Tak przygotowane preparaty należy następnie utrwalić za pomocą mieszaniny kwasu octowego lodowatego i alkoholu (etylowego lub metylowego). Przy dłuższym przechowywaniu materiał należy przełożyć do alkoholu etylowego 96% i trzymać w lodówce. Preparaty sporządza się metodą zgniataną, polegającą na maceracji tkanki, rozdrabnianiu na pojedyncze komórki i po nakryciu szkiełkiem nakrywkowym, silnym zgnieceniu w celu uwolnienia chromosomów z cytoplazmy. Wybarwienie chromosomów jest możliwe dzięki zastosowaniu odpowiednich barwników, do których należą m.in. acetoorceina, acetokarmin, nigrozyna. Obserwacje i analizę liczby chromosomów przeprowadzamy bezpośrednio pod mikroskopem

(rys. 4). Pewnym ułatwieniem, szczególnie przy dużej liczbie chromosomów, jest wykonanie rysunku lub fotografii poszczególnych płytek metafazowych (159).

Ocena liczby chromosomów jest wykorzystywana w wielu pracach naukowych i hodowlanych. D o r o s z e w s k a i in. w roku 2009 (56), przygotowując album dzikich gatunków z rodzaju *Nicotiana*, sporządzili preparaty mitotyczne ponad 60 gatunków zgromadzonych w kolekcji IUNG-PIB, w celu weryfikacji poprawności danych literaturowych. W hodowli mieszańców międzygatunkowych wymagana jest analiza cytologiczna na każdym etapie hodowli. D o r o s z e w s k a w 1994 (60) uzyskała mieszańca międzygatunkowego *N. tabacum* 'BP-210' × *N. africana*.



Rys. 4. Wybarwione chromosomy obserwowane pod mikroskopem świetlnym

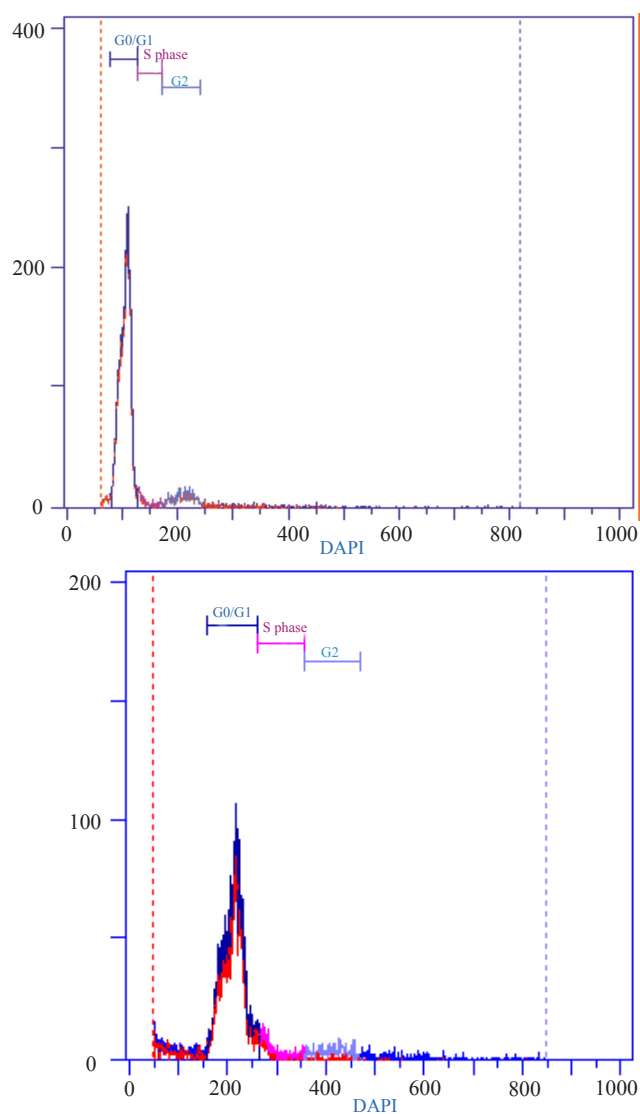
Źródło: Doroszevska i in., 2009 (56).

Ocenie cytologicznej podlegały amfihaploidalne rośliny pokolenia F_1 , płodne amfidiploidy uzyskane przez podwojenie w kulturach *in vitro* oraz formy seskwidiploidalne, a także dalsze pokolenia uzyskane w wyniku samozapylenia lub krzyżówek wstecznych z tytoniem uprawnym. Dalsze badania wyżej wymienionych form mieszańcowych z *N. africana* wykonano w pokoleniach BC_2 - BC_2F_6 . Obserwowano zmienną liczbę chromosomów mitotycznych w poszczególnych pokoleniach. Stabilne linie 48-chromosomowe stwierdzono w pokoleniu BC_2F_4 (61, 62).

Dziki gatunki tytoniu stanowią źródło odporności na wiele chorób, w tym choroby wirusowe. Z tego powodu dużo uwagi poświęca się hodowli odpornościowej. Krzyżowanie międzygatunkowe, jako krzyżowanie oddalone, wiąże się z licznymi trudnościami spowodowanymi różnicami w liczbie chromosomów. Oceny parowania chromosomów i, co za tym idzie, żywotności pyłku, dokonał B e r b e ć w roku 1987 (15), w mieszańcach F_1 *N. tabacum* × *N. benavidesii*, *N. knightiana* × *N. tabacum* oraz *N. raimondii* × *N. tabacum*. We wszystkich tych mieszańcach obserwowany był znaczny udział uniwalentów i kilku biwalentów. W latach 2003, 2007 T r o j a k - G o l u c h i B e r b e ć (180, 181) badali cytologicznie mieszańce *N. tabacum* × *N. glauca* na poziomie amfihaploidów, amfidiploidów i seskwi-

diploidów, natomiast Laskowska i Berbec w 2005 (108) badali w ten sam sposób mieszańca *N. tabacum* × *N. alata*. Badania cytologiczne na poziomie amfihaploidów przeprowadzono także dla mieszańców *N. wuttkei* Clarkson et Symon, która jest źródłem odporności na *Peronospora hyoscyami* de Bary, z trzema odmianami *N. tabacum* L. (odmiany: ‘Puławski 66’, ‘Wiślica’ i ‘TN 90’) (110).

Pomiary cytologiczne pozwalają odróżnić rośliny amfihaploidalne i amfidiploidalne lub haploidy i podwojone haploidy, czyli formy o różnej ploidalności. Jest to jednak metoda praco- i czasochłonna. W celu usprawnienia oceny ploidalności możliwe jest zastosowanie nowocześniejszych technik, takich jak na przykład cytometria przepływowa (ang. *flow cytometry*, FCM). Metoda ta była pierwotnie stosowana w diagnostyce klinicznej, a dopiero od początku lat osiemdziesiątych używana jest także w cytologii i cytogenetyce roślin (168). Cytometria przepływowa pozwala na pomiar zawartości jądrowego DNA oraz badanie cyklu komórkowego, poziomu endoreplikacji, wielkości genomu i opiera się na analizie względnej intensywności fluorescencji jąder barwionych fluorochromami. Cytometr może być też wyposażony dodatkowo w system segregujący przepływające komórki. Jest to technika, która nie tylko stanowi szybką metodę alternatywną wobec żmudnego liczenia chromosomów z zastosowaniem mikroskopu świetlnego, ale jest też znacznie dokładniejsza, np. pozwala na identyfikację miksploidów. Do przeprowadzenia pomiaru jądra komórkowe muszą być wyizolowane, zabarwione i znajdować się w postaci zawiesiny. Najczęściej wykorzystywanymi barwnikami fluorochromowymi są DAPI (indolo-4',6-dwuamidyno-2-fenylidyna), który przyłącza się do par AT w DNA oraz PI (jodek propidyny) interkalujący dwuniciowy DNA. Fluorescencja jąder jest proporcjonalna do zawartości DNA (159). Wyniki pomiarów na cytometrze przepływowym przedstawiane są w postaci danych liczbowych oraz wykresów dwu- i trójwymiarowych. Wykresy są w postaci cytogramów i histogramów, choć do wizualizowania wyników związanych z fluorescencją zwykle stosowane są histogramy (rys. 5). Ta szybka i bardzo dokładna metoda jest obecnie często stosowana w hodowli i nasiennictwie wielu roślin uprawnych. Przykładowo, stosując FCM można oznaczać ploidalność komponentów męczyznych, zapylaczy i mieszańców w trakcie procesu hodowlanego, a także sprawdzać jednorodność nasion o przeznaczeniu handlowym (167). Techniki cytometrii przepływowej stosuje się powszechnie w badaniach hodowlanych prowadzonych w IUNG-PIB. W roku 2011 Trojan-Goluch i in. (182) wykorzystali tę metodę do szybkiego odróżniania roślin haploidalnych od roślin o innej ploidalności w badaniach, których celem było uzyskanie roślin haploidalnych z pylników pokolenia F₁ mieszańców linii WGL 3 i linii PW-834, które łączą w sobie odporność na *Thielaviopsis basicola* i *Tomato spotted wilt virus* (TSWV).



Rys. 5. Histogramy uzyskane z cytometru przepływowego pozwalające na odróżnienie haploidów i diploidów

Źródło: A. Czubačka, A. Trojak-Goluch, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB.

Transformacja i tworzenie form transgenicznych

Rozwój kultur *in vitro*, inżynierii genetycznej i genetyki molekularnej pozwolił na opracowanie molekularnych technik uzyskiwania genetycznie zmodyfikowanych odmian różnych roślin, w tym tytoniu, które są całkowicie odmienne od metod klasycznych, np. tradycyjnego krzyżowania. Wśród organizmów o zmodyfikowanej informacji genetycznej istotną rolę odgrywają rośliny transgeniczne.

Transformacja genetyczna polega na wprowadzeniu do genomu biorcy fragmentu DNA dawcy, dzięki czemu nabywa on określonych, nowych, unikalnych cech, które warunkowane są przez dany fragment DNA i tym samym staje się on organizmem genetycznie zmodyfikowanym (GMO). Tradycyjna hodowla mająca na celu ulepszenie genotypu, opierająca się na krzyżowaniu międzyodmianowym czy międzygatunkowym, nastrocza często szeregu trudności wiążących się z istnieniem barier krzyżowalności czy z koniecznością wyeliminowania na drodze selekcji niekorzystnych cech, które także zostały przeniesione. Alternatywą dla tego często żmudnego i czasochłonnego procesu jest transformacja genetyczna. Transformacja zapewnia precyzyjną modyfikację genomu, dlatego zmiany w genotypie rośliny nie są tak duże, co prowadzi do krótszej i bardziej efektywnej stabilizacji genotypu oraz selekcji w kierunku pożądaných cech. Do tej pory wykorzystując różne techniki transformacji otrzymano nowe odmiany roślin charakteryzujące się np. zwiększoną odpornością na owady, odporne na patogeny, herbicydy czy służące jako swoiste bioreaktory do produkcji określonych metabolitów wtórnych i rekombinowanych białek. Technika ta omija skutecznie bariery krzyżowalności i pozwala na przenoszenie do genomu biorcy genów kodujących pożądanę cechy nie tylko od roślin, ale także od zwierząt i mikroorganizmów (89).

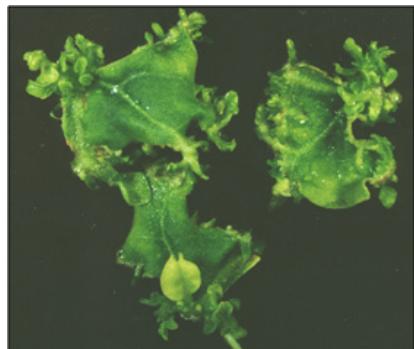
Obecnie istnieje kilkanaście metod transformacji genetycznej roślin, które w zależności od mechanizmu można podzielić na dwie grupy: na transformację wektorową i bezwektorową. Metodę transformacji różnych gatunków roślin dostosowuje się do ich indywidualnych właściwości i bierze się pod uwagę cechy danej rośliny, takie jak np. efektywność regeneracji w warunkach *in vitro*, ale także cechy transgenu i wydajność jego ekspresji. W transformacji wektorowej wektorami są określone, zmodyfikowane plazmidy Gram-ujemnych bakterii glebowych z rodzaju *Agrobacterium*, głównie *A. tumefaciens* i *A. rhizogenes*. Bakterie te w odpowiedzi na określone sygnały z komórek roślinnych mają naturalną zdolność do infekcji, czyli przekazywania fragmentu DNA własnego plazmidu do jąder komórkowych, gdzie dochodzi do stabilnej integracji z genomem biorcy. W przypadku transformacji roślin jest to najbardziej wydajna, najmniej kosztowna i obecnie najczęściej wykorzystywana metoda (76). Pozwala na wprowadzenie dość dużych fragmentów DNA i ich stabilną integrację z genomem biorcy. Dużą zaletą jest także przenoszenie do genomów biorcy jedynie od jednej do kilku kopii transgenów. W warunkach naturalnych pierwszym etapem przenoszenia genów jest kolonizacja bakterii na fragmencie uszkodzonej tkanki roślinnej, a następnie aktywacja i ekspresja genów wirulencji bakterii pod wpływem różnych związków, głównie fenolowych i monocukrów, wydzielanych przez zranioną tkankę. W wyniku tego powstaje szereg białek, które pełnią różnorakie funkcje, np. są czynnikami transkrypcyjnymi, odpowiadają za aktywację innych białek poprzez fosforylację, pełnią rolę endonukleaz wycinających fragment DNA, czy tworzą tzw. kanał transferowy, przez który DNA jest przenoszony do rośliny. Oprócz genów wirulencji, które bezpośrednio zaangażowane są w transformację i są zlokalizowane na plazmidzie

w postaci sześciu operonów *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG* w procesie przeniesienia uczestniczą także geny znajdujące się na chromosomie głównym bakterii, które odpowiedzialne są m.in. za regulację ekspresji genów *vir*, syntezę i transport wielu związków czy za syntezę białek niezbędnych bakteriom do adhezji na powierzchni rośliny (51). To właśnie dzięki tej kaskadzie różnych czynników możliwe jest wycięcie, zreplikowanie, transport, a następnie integracja z genomem biorcy fragmentu nazwanego T-DNA (ang. *transfer DNA*), który znajduje się w obrębie plazmidu Ti (ang. *tumor inducing*) lub Ri (ang. *root inducing*) w zależności od gatunku bakterii. W integrację T-DNA z genomem biorcy zaangażowane są także białka jądrowe rośliny. W komórkach *Agrobacterium* może znajdować się od jednego do kilku takich plazmidów, a każdy z nich może zawierać jeden bądź więcej fragmentów T-DNA.

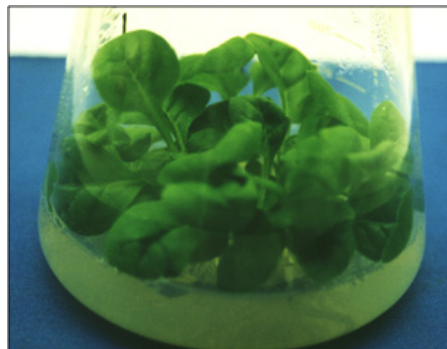
Naturalną zdolność bakterii *Agrobacterium* do infekowania roślin wykorzystano w warunkach *in vitro* do przeprowadzania różnych modyfikacji genetycznych. Dzięki temu, że geny znajdujące się w obrębie T-DNA nie odpowiadają za wycinanie czy przenoszenie DNA, możliwe jest wklonowanie w ich miejsce dowolnych konstrukcji genowych i tym samym skuteczne przeniesienie i zintegrowanie ich z genomem biorcy (124). W warunkach *in vitro* pierwszym etapem transformacji wektorowej z udziałem specjalnie przygotowanej kultury *Agrobacterium* jest inokulacja eksplantatu pochodzącego ze sterylnej hodowli w zawieszynie bakteryjnej przez około kilkanaście minut. W przypadku tytoniu, który odznacza się dużymi możliwościami regeneracyjnymi i wysokim powinowactwem do *A. tumefaciens* transformacja przebiega szybko i wydajnie, a powszechnie stosowaną metodą zapoczątkowaną w 1984 roku jest metoda krążków liściowych (90). Komórki bakterii w obszarze T-DNA plazmidów mają wklonowany konstrukt genowy składający się zazwyczaj z pożądanego transgenu i genu selekcyjnego, czasami także genu reporterowego. Po etapie inokulacji, która trwa maksymalnie do kilkudziesięciu minut i opłukaniu eksplantatów w wodzie destylowanej są one wykładane na pożywki regeneracyjne bez antybiotyków zwykle na okres kilku dni. W tym czasie dochodzi do przekazania T-DNA bakterii wraz z wklonowanym konstruktem do komórek roślinnych. Następnie krążki liściowe przenosi się na taką samą pożywkę regeneracyjną zawierającą dodatkowo antybiotyki kanamycynę i karbenicylinę w celu eliminacji bakterii i selekcji transformantów. Po kilku tygodniach zregenerowane pędy przenosi się na pożywkę ukorzeniającą zawierającą obydwie antybiotyki (58) (rys. 6). Jeśli konstrukt zawierał także geny reporterowe, np. białka zielonej fluorescencji GFP, lucyferazy czy β -glukuronidazy, selekcja tkanek transformowanych może opierać się na metodach histochemicznych lub bardziej dokładnych technikach molekularnych z wykorzystaniem specyficznych starterów i reakcji PCR (124).

Tytoń łatwo ulega transformacji przy użyciu skutecznej i taniej metody wektorowej z wykorzystaniem bakterii, dlatego nie stosuje się powszechnie innych metod do jego transformacji. Dla roślin, u których agroinfekcja w ogóle nie zachodzi, jest

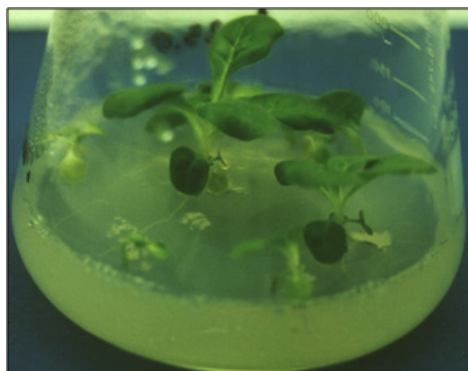
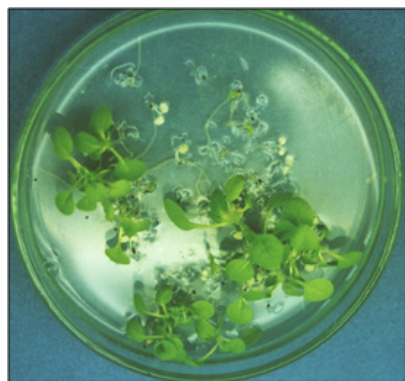
mało skuteczna lub pojawiają się trudności w regeneracji roślin w kulturach *in vitro* stosuje się inne metody, takie jak infiltrację, technikę PTP (ang. *pollen tube pathway*), mikrowstrzeliwanie, czy technikę z wykorzystaniem włókien krzemowo-karbidowych (124). W przypadku tytoniu stosuje się bezwektorową metodę biolistyczną, czyli mikrowstrzeliwanie, zwłaszcza w przypadku transformacji plastydów.



Transformacja krążków liściowych przy pomocy *Agrobacterium tumefaciens*



Regeneracja i selekcja roślin transformowanych na pożywce z antybiotykiem



Selekcja roślin transgenicznych na pożywce z antybiotykiem

Rys. 6. Transformacja genetyczna tytoniu

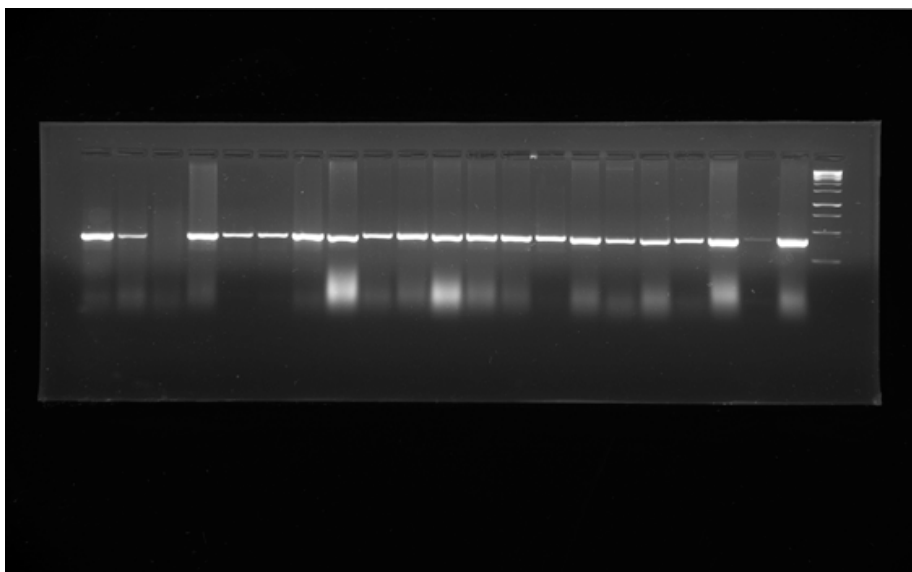
Źródło: Doroszevska, 2004 (58).

W tym celu wykorzystuje się jako nośniki cząsteczki złota lub wolframu, które opłaszczone są cząsteczkami DNA. Po umieszczeniu nośników z DNA na powierzchni tkanek w atmosferze częściowej próżni i w obecności sprężonego helu zaczynają one z dużą szybkością penetrować tkanki. Możliwe jest wprowadzenie nawet kilku transgenów o dowolnie wybranych długościach. Jest to metoda skuteczna, ale wymagająca specjalnego sprzętu i odczynników. Inną techniką, którą także zastosowano u tytoniu, jest transformacja z zastosowaniem *Agrobacterium* wspomaganą sonifikacją (SAAT, ang. *sonication-assisted Agrobacterium transformation*). Eksplantaty w obecności *Agrobacterium* są poddawane przez krótki okres działania

ultradźwięków, co powoduje powstanie wielu jednakowych uszkodzeń na powierzchni tkanki. Ułatwia to bakteriom dostęp do wnętrza komórek i znacznie poprawia wydajność transformacji (165).

Duże możliwości regeneracyjne tytoniu oraz łatwość przeprowadzania transformacji prostą metodą wektorową z *Agrobacterium* spowodowała, że badania nad transformacją tytoniu rozwijały się bardzo dynamicznie. Z praktycznego punktu widzenia szczególnie istotne są badania nad uzyskiwaniem odmian odpornych, np. na patogeny wirusowe, grzybowe, bakteryjne lub na herbicydy. Prace badawcze nad transformacją prowadzone w IUNG-PIB opierały się na uzyskaniu odporności tytoniu na najważniejsze gospodarczo izolaty wirusa Y ziemniaka PVY. Ponieważ choroby wirusowe stanowią istotny problem w uprawie tytoniu, głównie ze względu na brak możliwości ich zwalczania metodami chemicznymi (47), tak ważne staje się poszukiwanie innych metod ochrony roślin przed wirusami m.in. poprzez transformację. Połączenie zaś technik transformacji z mechanizmem naturalnej odporności staje się doskonałym narzędziem do uzyskiwania trwalszej odporności na choroby wirusowe (58). Do transformacji użyto trzech konstrukcji genowych: konstrukcji LMVCP niosącej gen białka płaszczka wirusa mozaiki sałaty (LMV) i konstrukcji pROKY niosącej zmodyfikowany gen polimerazy wirusa PVY ze wstawką wirusową w orientacji sensownej (pROKY1) oraz w orientacji antysensownej (pROKY2). Konstrukcje te były sprzężone z markerem selekcyjnym, którym był gen fosfotransferazy neomycynowej, warunkujący odporność na kanamycynę. Uzyskane wyniki procesu transformacji były pomyślne, co w dużej mierze jest zasługą dobrze dobranych warunków regeneracji roślin w kulturze *in vitro*. Regeneracja roślin z eksplantatów na podłożu z kanamycyną była na poziomie 40-50% u trzech odmian transformowanych przy użyciu LMVCP oraz czterech odmian transformowanych wektorami pROKY1 i pROKY2. Detekcja wybranych roślin transgenicznych z użyciem technik molekularnych wykazała skuteczną transformację z wykorzystaniem wszystkich trzech konstrukcji genowych (58). Celem dalszych badań było porównywanie skuteczności zastosowanych konstrukcji genowych oraz analiza ekspresji transgenów w dalszych pokoleniach roślin transgenicznych (rys. 7). Analiza taka wykazała m.in. największą skuteczność transgenu LMVCP w ochronie antywirusowej oraz stabilizację cechy odporności w dalszych pokoleniach. W przypadku dwóch pozostałych transgenów szybka stabilizacja dziedziczenia transgenu niestety nie przekładała się na odporność roślin w następnych pokoleniach co przypuszczalnie było skutkiem wzrostu metylacji wirusowej wstawki (47).

Przeprowadzono także badania porównawcze między liniami transgenicznymi i nie poddanymi transformacji pod względem ważnych cech biologicznych i agrotechnicznych, m.in. wysokości roślin i ich morfologii, powierzchni liści, przebiegu mejozy i żywotności pyłku, składu chemicznego liści i wykazano jedynie nieznaczne różnice, głównie w jakości wysuszonych liści (46). Podobne badania porównawcze, obejmujące m.in. charakterystykę wzrostu, morfologię, jakość i skład chemiczny liści oraz inne ważne cechy użytkowe, przeprowadzone na plantacjach tytoniu



Rys. 7. Elektroforetyczna analiza produktów amplifikacji metodą PCR transgeny ROKY obecnego w roślinach tytoniu odmiany 'AC Gayed'

Źródło: fot. A. Czubacka, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB.

w Chinach także nie wykazały znacznych różnic. Nie wykazano różnic w jakości i składzie chemicznym liści, jedynie linia transgeniczna charakteryzowała się lepszym plonowaniem (191). Uzyskiwanie odporności na PVY poprzez transformację genem białka płaszczka wirusa PVY (CP), wirusa mozaiki sałaty LMV (CP) czy genem polimerazy PVY było i nadal jest przedmiotem wielu badań, np. uzyskano pięć linii odpornych na wirusa transformując je genem białka płaszczka CP z węgierskiego izolatu PVY-H czy uzyskano transgeniczny, odporny tytoń odmiany 'Xanthi', używając jako transgeny zmodyfikowanego genu białka płaszczka wirusa mozaiki sałaty (58). We wszystkich powyższych badaniach odporność na wirusa PVY uzyskiwano transformując rośliny naturalnymi genami pochodzącymi z wirusów. Metoda ta jest coraz częściej stosowana w zapobieganiu chorobom wirusowym, a odporność taka nazywana jest odpornością pochodzącą od patogena (ang. *patogen derived resistance*, PDR). Pierwsze próby uzyskiwania odporności tą drogą polegały na introdukcji do genomu biorcy genów kodujących białko płaszczka (CP) wirusa, a odporność taka nazywana jest odpornością uzyskaną za pośrednictwem CP (ang. *coat protein-mediated protection*). Innym rodzajem odporności jest odporność warunkowana genem kodującym wirusową replikazę (ang. *replicase-mediated*). Podstawową różnicą między powyższymi rodzajami odporności jest to, że odporność warunkowana RNA odznacza się wysoką specyficznością, czyli chroni przed infekcją przez szczep, z którego pochodził transgen, bądź przez szczep blisko spokrewniony (58).

Metodę transformacji wykorzystano także do uzyskania odporności tytoniu na inne choroby wirusowe. Anderson i in. w roku 1989 (3) transformowali

tytoń genem białka płaszcza jednego ze szczepów mozaiki tytonowej (TMV). Uzyskane rośliny wykazywały odporność nie tylko na TMV, ale miały podwyższoną odporność na inne choroby powodowane przez AMV, PVY, PVX i CMV. Wysoki stopień odporności tytoniu odmiany 'Burley 49' na cętkowaną plamistość liści tytoniu (TEV) uzyskano dzięki transformacji genem białka płaszcza TEV (115). W przypadku uzyskiwania odporności na brązową plamistość pomidora na tytoniu (TSWV) transformowano 12 odmian uprawnych tytoniu genem N w orientacji sens, kodującym nukleoproteinę N z izolatu L3 wirusa (izolat bułgarski) i już w pokoleniu R₂ uzyskano kompletnie odporne linie sześciu odmian. Po zanalizowaniu dziedziczenia w pokoleniach R₃-R₆ i wyselekcjonowaniu linii odpornych wykazano, że odporność dziedziczy się w sposób stabilny (169). Oprócz badań w kierunku uzyskiwania odporności na choroby wirusowe prowadzone są także badania nad odpornością bakteryjną. W roku 1998 B a t c h v a r o v a i i n. (9) transformowali sześć odmian tytoniu plazmidem zawierającym gen *ttr*, warunkujący odporność na *Pseudomonas syringa* pv. *tabaci*. Stwierdzili oni, że odporność na tę bakterię uzyskana drogą transformacji jest dziedziczna, a wzrost liczby roślin odpornych w kolejnych pokoleniach świadczy o dobrej transmisji transgeny. Jednak stabilne linie odporne i homozygotyczne pod względem genu *ttr* uzyskano w zależności od odmiany w pokoleniach R₄-R₇. Badania nad zwiększeniem odporności tytoniu, a także *Arabidopsis thaliana* na patogeny grzybowe prowadzili m.in. S h u k u r o v i i n. w roku 2012 (166) transformując rośliny trzema konstrukcjami zawierającymi geny kodujące białka o właściwościach przeciwgrzybowych, pochodzące od innej rośliny – gwiazdnicy pospolitej (*Stellaria media* L.). Rośliny transgeniczne niosące pełnej długości gen dla białka *pro-SmAMP1* wykazywały najwyższą odporność wobec takich patogenów grzybowych jak *Bipolaris sorokiniana* oraz *Thielaviopsis basicola*. Transformacja tytoniu obejmuje nie tylko badania nad uzyskaniem odporności na choroby, ale także dotyczy odporności na herbicydy (52) i szkodniki, np. mszycę brzoskwińowo-ziemniaczaną *Myzus persicae* (35) oraz nad zwiększoną tolerancją na stresy abiotyczne, takie jak duże zasolenie, temperatura, stres osmotyczny (2, 200).

Transformacji genetycznej oprócz genomu jądrowego może także podlegać stabilny genom chloroplastowy. Tytoń był pierwszą rośliną wyższą, u której przeprowadzono ten typ transformacji z dużą wydajnością i obecnie jest to roślina modelowa, która bardzo często jest wykorzystywana, np. do produkcji ważnych białek. Transformacja plastydów znalazła zastosowanie w badaniach podstawowych plastydów, w ulepszaniu genotypów poprzez wprowadzanie genów odporności na choroby czy stresy abiotyczne, ale także w produkcji na większą skalę ważnych białek rekombinowanych o znaczeniu terapeutycznym, np. somatotropiny ludzkiej, przeciwciał monoklonalnych, interferonów, enzymów (152). W wielu wypadkach wybór transformacji chloroplastowej jest lepszy, a korzyści z zastosowania tej technologii to m.in.: możliwość uzyskania wysokiej ekspresji transgeny, co w przypadku uzyskiwania białek rekombinowanych jest bardzo istotne, wprowadzanie transgeny w określone miejsce w wyniku homologicznej rekombinacji, możliwość ekspres-

ji różnych transgenów w jednym czasie, łatwa eliminacja genów markerowych, a także nierozprzestrzenianie się transgenów z pyłkiem roślin. Transformacja plastydów nie zachodzi z udziałem *A. tumefaciens*, ale specjalnie skonstruowanych wektorów. Podstawą wektora jest określona sekwencja genomu plastydowego organizmu, u którego chcemy dokonać transformacji, dzięki temu proces transformacji jest miejscowo specyficzny. Jest to tzw. lewa i prawa sekwencja flankująca, każda o wielkości około 1-2 kb (121). Integracja transgenu do genomu chloroplastowego zachodzi poprzez homologiczną rekombinację pomiędzy sekwencjami flankującymi wektora a genomem plastydowym. Są wprowadzane konstruowane wektory, które mogą być użyte do transformacji większej liczby roślin, ale warunkiem ich zastosowania jest istnienie dostatecznego poziomu homologii sekwencji flankujących i genomu gospodarza. Konstrukty zawierające sekwencje flankujące, gen, którego ekspresję chcemy uzyskać i gen markerowy jest wprowadzany do komórek z użyciem techniki biolistycznej (mikrowstrzeliwania), PEG-u lub protoplastów. Selekcja roślin transplastomicznych, czyli zawierających transgen odbywa się na pożywkach selekcyjnych. Do tej pory skonstruowano wiele wektorów do transformacji chloroplastowej tytoniu, które skierowane są na różne regiony genomu chloroplastowego. M a d a n a l a i i n. w roku 2012 (121) skonstruowali wektor do transformowania plastydów tytoniu w celu otrzymywania rekombinowanego białka YFP. Wyznaczyli także nowe miejsca włączania konstruktu do genomu. Sekwencje flankujące, odpowiednie do wybranego regionu genomu, zostały wyznaczone poprzez analizę BLAST aby zapewnić odpowiedni poziom homologii także dla innych gatunków roślin. Rośliny transplastomiczne, które otrzymano odznaczały się wysokim poziomem ekspresji białka YFP na poziomie 5-6% wszystkich rozpuszczalnych białek.

Transformacja tytoniu pozwala na prowadzenie nie tylko szerokich badań nad stabilnością wbudowanych genów i ich wpływem na cechy użytkowe roślin, ale także ma wymiar bardzo praktyczny. Tytoń i jego transformacja jest przedmiotem wielu badań i bardzo ciekawych wyników w zakresie produkcji pożądanych przez człowieka związków (praca dr. M. Przybysia w niniejszym zeszycie „Studia i Raporty IUNG-PIB”). Obecnie transgeniczny tytoń, podobnie jak inne transgeniczne rośliny nie jest dopuszczony do komercyjnej uprawy. Niezwykle istotne jest natomiast, aby z chwilą prawnej i publicznej akceptacji upraw roślin transgenicznych były one przygotowane w ośrodkach naukowych ze względu na konkurencyjność produktów rolniczych na rynkach światowych (58).

Cytoplazmatyczna męska sterylność

Hodowla tytoniu, podobnie jak innych gatunków roślin uprawnych, opiera się często na krzyżowaniu i uzyskiwaniu form mieszańcowych. Poza odmianami, stosuje się często także gatunki dzikie, stanowiące rezerwuar wielu genów.

Zastosowanie krzyżowania oddalonego powoduje w wielu przypadkach powstanie form cytoplazmatycznie męskosterylnych (cms). Przyczyną cytoplazmatycznej

męskiej jałowości jest brak współdziałania pomiędzy odpowiednimi czynnikami genetycznymi jądra i cytoplazmy, odpowiedzialnymi za rozwój męskich organów generatywnych i mikrosporogenezę. Powstaje ona w mieszańcach oddalonych, gdzie jądro komórkowe jednego gatunku nie współgra prawidłowo z cytoplazmą drugiego. Ogromną rolę w tym procesie odgrywa mitochondrium. Cytoplazmatyczna męska sterylność obejmuje szereg procesów prowadzących do zaburzeń mikrosporogenezy, co powoduje tworzenie niefunkcjonalnych mikrospor lub ziaren pyłku. Zaburzenia cytologiczne ujawniają się przede wszystkim w dwóch tkankach: tapetum i komórkach macierzystych pyłku (KMP). Tapetum to warstwa komórek bezpośrednio otaczająca różnicujące się KMP oraz odżywiająca je. Komórki tapetum w roślinach cms charakteryzują się nadmierną wakuolizacją, utratą charakteru komórkowego tkanki i tworzeniem wielojądrowych syncytiów, jak również występują zaburzenia czasu naturalnej degeneracji, polegające na opóźnionym lub przedwczesnym obumieraniu. Badania wykazały, że u męskosterylnych roślin w tapetum i mikrosporach mitochondria często są mniejsze, a system grzebieni znacznie uboższy, z nienaturalnie rozdętymi membranami, natomiast w roślinach płodnych mitochondria posiadają doskonale rozbudowany system grzebieni wewnętrznych. Mitochondrialny DNA roślin odznacza się wysokim stopniem skomplikowania, zarówno pod względem struktury, jak i mechanizmów związanych z przetwarzaniem informacji genetycznej. Tylko nieduża część genomu mitochondrialnego zawiera sekwencje kodujące białka. Ponadto posiada on pewną liczbę tzw. otwartych ramek odczytu (*orf*), mogących potencjalnie kodować geny, których funkcja pozostaje jak dotąd nieznana. W mtDNA występują również sekwencje homologiczne z DNA jądrowym i chloroplastowym oraz małe i duże sekwencje powtórzone (125). Cytoplazmatyczna męska sterylność to cecha dziedziczona po formie matczynej, tzn. jest przenoszona do kolejnych pokoleń przez rośliny mateczne niezależnie od użytej formy ojcowskiej (5, 25, 88, 116, 138).

Cytoplazmatyczna męska sterylność jest zjawiskiem naturalnym u roślin wyższych, odnotowanym u ponad 150 gatunków. Cms u tytoniu, podobnie jak w przypadku innych gatunków uprawnych (kapusty, marchwi, cebuli, ryżu, sorga, słonecznika, pszenicy, jęczmienia, kukurydzy, soi, bawełny i wielu innych), stanowi podstawę dla rozwoju i produkcji mieszańców F_1 dla celów komercyjnych. Niezdolność do wytwarzania funkcjonalnego pyłku eliminuje konieczność przeprowadzania pracochłonnej, ręcznej kastracji pylników oraz gwarantuje, że otrzymane nasiona są wynikiem kierunkowego krzyżowania, a nie samozapylenia. Ponadto formy cytoplazmatycznie męskojałowe pozwalają na ochronę praw autorskich hodowcy, gdyż zapobiegają nieautoryzowanej produkcji nasion. Stanowią też cenny materiał użytkowy oraz materiał do badań cytologicznych, fizjologicznych i molekularnych zmierzających do poznania mechanizmów odpowiedzialnych za ekspresję cechy niepłodności pyłku (13, 125). Formy męskosterylne możemy otrzymać na drodze hodowli poprzez selektywną eliminację chromosomów rośliny matczynej

i zastępowaniu ich chromosomami innego gatunku na drodze krzyżowania wstecznego. W przypadku tytoniu, w mieszańcach pozostaje cytoplazma rośliny matecznej, najczęściej dzikiego gatunku z rodzaju *Nicotiana*, zaś formę ojcowską, warunkującą genom, stanowi *N. tabacum* (33, 146, 151).

Ze względu na czas, w którym następuje załamanie męskiego rozwoju generatywnego, G a b e l m a n w 1956 roku (74) podzielił cytoplazmatyczną męską sterylność na pyłkową, pręcikową i funkcjonalną. Pierwsza ma charakter postmejoetyczny i objawia się zaburzeniami w rozwoju mikrospor po fazie tetrad, co może prowadzić do braku pyłku lub wytwarzania pyłku niefunkcjonalnego w morfologicznie niezmienionych lub mało zmienionych pylnikach. Druga objawia się zmianami degeneracyjnymi całych pręcików, w których często nawet nie dochodzi do tworzenia komórek mejotycznych lub też pojawia się silna nieregularność w podziałach mejotycznych. Funkcjonalna męska sterylność występuje wtedy, gdy mikrospory rozwijają się normalnie, ale nie dochodzi do ich uwolnienia wskutek niepęknięcia pylników. W rodzaju *Nicotiana* przeważa typ pręcikowy (79).

C h a p l i n w roku 1962 (37) wyróżnił kilka typów męskiej sterylności w zależności od użytego gatunku dzikiego:

- typ pierwszy to normalnie wykształcone męskie organy generatywne;
- typ drugi to kwiaty męskosterylne, pylniki skurczone, ale nitki pręcików o normalnej długości (*N. bigelovii*);
- typ trzeci to nitki pręcików skrócone i pylniki zdegenerowane (*N. megalosiphon* i *N. suaveolens*);
- typ czwarty to pylniki o skróconych nitkach nie zawierające ziaren pyłku (*N. plumbaginifolia*);
- typ piąty to przekształcone pylniki w formie płatków korony (*N. undulata*),
- typ szósty to zniekształcone płatki korony i zdegenerowane pylniki (*N. debneyi*).

Ponadto, czasem występuje zjawisko feminizacji męskich organów generatywnych, czyli pojawiania się słupków ze znamionami w miejscu pręcików (*N. repanda*) (78).

Wpływ cytoplazmy na powstawanie męskiej sterylności u tytoniu może być w pewnym stopniu modyfikowany przez czynniki środowiska. Ta sama odmiana męskosterylna może być częściowo płodna w określonych warunkach. Odgrywają tu rolę takie czynniki jak długość dnia, warunki termiczne oraz intensywność światła (146). B e r b e ć i B e r b e ć w roku 1976 (18) badali wzrost i rozwój form tytoniu (*N. tabacum*) odtworzonych na cytoplazmie *N. glauca* w zróżnicowanych warunkach fotoperiodu. Kontrolę stanowiły genetycznie analogiczne formy roślin z normalną i zmutowaną cytoplazmą *N. tabacum*. We wszystkich warunkach fotoperiodu badane rośliny były męskosterylne. W pewnych układach fotoperiodycznych rosły one szybciej i wytwarzały większą masę wegetatywną oraz różniły się przebiegiem rozwoju generatywnego w porównaniu do obu formami z cytoplazmy *N. tabacum*.

Związek cytoplazmy z męską jałowością roślin odkrył w 1906 roku C o r r e n s (43). Początek badań nad cytoplazmatyczną męską jałowością w rodzaju *Nicotiana*

wiąże się z wykryciem w roku 1928 przez E a s t' a (66) męskojałowych roślin w potomstwie mieszańca *N. sanderae* × *N. langsdorfii*. Pierwszą alloplazmatyczną formę tytoniu uprawnego *N. tabacum* z podstawioną cytoplazmą gatunku *N. debneyi* opisał w roku 1950 C l a y t o n (42). Płodne amfidiploidy *N. debneyi* × *N. tabacum* kilkakrotnie krzyżował wstecznie z *N. tabacum*, jako rodzicem ojcowskim, uzyskując już w pokoleniu seskwidiploidalnym rozszczerzenie na formy o różnym stopniu męskiej płodności. W pokoleniu BC₃ występowały już niemal wyłącznie rośliny męskojałowe. Cecha męskiej jałowości była przekazywana bez wyjątku na wszystkie rośliny dalszych pokoleń uzyskanych w wyniku krzyżowania wstecznego z tytoniem uprawnym. Powyższy schemat lub jego modyfikacje zastosowano przy uzyskaniu prawie wszystkich następných form alloplazmatycznych. Przeniesienie cytoplazmy *N. repanda* do *N. tabacum*, ze względu na bariery krzyżowalności, odbyło się z zastosowaniem tzw. krzyżowania pomostowego. Formę pomostową stanowił mieszańiec *N. sylvestris* × *N. tabacum*. Na drodze krzyżowania międzygatunkowego pomiędzy *N. excelsior* × *N. tabacum*, *N. amplexicaulis* × *N. tabacum* oraz *N. rustica* × *N. tabacum* uzyskano formy cytoplazmatycznie męskosterylne. Ostatnia krzyżówka wymagała krzyżowania pomostowego z *N. alata* (139). Formę *N. tabacum* z cytoplazmą *N. eastii* uzyskano natomiast już w pierwszym pokoleniu mieszańcowym. Substytucja cytoplazmy polegała tu prawdopodobnie na procesie androgenezy lub selektywnej eliminacji chromosomów gatunku dzikiego w jej toku (19). Formę alloplazmatyczną typu *tabacum* odkryto jako spontaniczną mutację (20). Cytoplazmatyczną męską sterylność uzyskano również w przypadku, gdy rodzicem żeńskim był gatunek uprawny. Przykładami takich krzyżówek międzygatunkowych są *N. tabacum* × *N. glutinosa*, *N. tabacum* × *N. plumbaginifolia*, *N. tabacum* × *N. glauca* oraz *N. tabacum* × *N. alata*. Przypuszcza się, że mechanizm powstawania tego typu męskiej jałowości polega na indukcji zmian w cytoplazmie przez gen lub geny jądrowe gatunku dzikiego we wczesnych pokoleniach mieszańcowych (30, 79, 138, 170). W 2007 roku uzyskano nową męskosterylną linię *N. tabacum* odmiany 'Wiślica' z cytoplazmą pochodzącą od *N. wuttkei* (109). Rośliny alloplazmatycznego analogu odmiany 'Wiślica' z cytoplazmą *N. wuttkei* były niższe, zakwitwały później i miały liście o mniejszej powierzchni w porównaniu z roślinami wyjściowej odmiany płodnej.

Na początku lat 70. XX wieku założono w Puławach kolekcję alloplazmatycznych form tytoniu uprawnego *N. tabacum*, w oparciu o genotyp jądrowy odmiany 'Zamojska 4'. Kolekcję stopniowo rozbudowywano poprzez włączenie do niej alloplazmatycznych form uzyskanych w IUNG-PIB, a także sprowadzonych z innych placówek naukowych. Listę form wraz z miejscem pochodzenia podano w tabeli 1. Obserwacje zmian dotyczących budowy kwiatu i pokroju roślin u alloplazmatycznych form *N. tabacum* odmiany 'Zamojska 4' prowadzono w warunkach polowych (tab. 1) (17). Z uwagi na szersze wykorzystanie w uprawie odmiany 'Wiślica' niż odmiany 'Zamojska 4', wszystkie rodzaje cytoplazmatycznej męskiej jałowości przeniesiono do 'Wiślicy'. Wymienione linie allo-

plazmatyczne *N. tabacum* odmiany 'Wiślica' są przechowywane w kolekcji IUNG-PIB w Puławach. Morfologia kwiatów większości alloplazmatycznych form *N. tabacum* 'Wiślica' nie różniła się od swoich analogów w odmianie Zamojska 4. Pewne różnice zaobserwowano dla cms *N. amplexicaulis*, cms *N. debneyi*, cms *N. megalosiphon* oraz cms *N. undulata*. Badania polowe wykazały ponadto zwiększoną podatność na wirusa Y ziemniaka (PVY) w przypadku cms *N. exigua*, cms *N. suaveolens*, cms *N. amplexicaulis*, cms *N. knightiana*, cms *N. occidentalis*, jak również kilka form (cms *N. bigelovii*, cms *N. exigua*, cms *N. occidentalis* i cms *N. undulata*) zostało porażonych przez *Cercospora nicotianae* powodującą białe plamy na liściach (13). U niektórych alloplazmatycznych analogów odmiany 'Zamojska 4' obca cytoplazma podwyższała podatność na mączniaka rzekomego tytoniu (formy cms *N. eastii*, cms *N. plumbaginifolia* i cms *N. glutinosa*) (17).

Informacje dotyczące podatności na choroby oraz morfologii roślin są niezwykle cenne, gdyż najczęściej używanymi źródłami cytoplazmatycznej męskiej jałowości w przemysłowych odmianach i mieszańcach tytoniu jest cms *N. suaveolens* i cms *N. undulata* (13, 17).

Niektóre formy męskosterylne tytoniu oparte na cytoplazmie dzikich gatunków posiadają wiele cech niepożądanych cech użytkowych. Stwierdzono u nich wolniejszy wzrost, późniejsze zakwitanie, zmniejszenie liczby liści, obniżkę plonu i pogorszenie jakości surowca (146). W niektórych przypadkach obca cytoplazma może korzystnie wpływać na produkcję alkaloidów. Wprowadzenie obcego plazmonu modyfikuje cechy tytoniu uprawnego związane z wartością użytkową. Powszechnie obserwowanym zjawiskiem u form alloplazmatycznych jest zahamowanie wzrostu, szczególnie początkowego (*N. megalosiphon*, *N. debneyi*, *N. suaveolens*, *N. plumbaginifolia*), opóźnienie zakwitania, zmniejszenie liczby liści i ich rozmiarów (*N. raimondii*, *N. knightiana*). Dwa ostatnie czynniki są najczęstszą przyczyną obniżenia plonu. Pogorszenie jakości wysuszonego surowca powodowała cytoplazma *N. megalosiphon*, *N. bigelovii* i *N. plumbaginifolia*. Takiego negatywnego wpływu nie wywoływały natomiast *N. undulata* i *N. suaveolens* (16).

W celu uzyskania form cms, poza tradycyjnym krzyżowaniem międzygatunkowym, obecnie wykorzystuje się kilka metod inżynierii genetycznej (125, 151):

- potranskrypcyjne wyciszanie genów jądrowych odpowiedzialnych za produkcję pylników w roślinach transgenicznych;
- potranskrypcyjne wyciszanie genów mitochondrialnych, np. zablokowanie ekspresji dehydrogenazy pirogronianowej w tapetum pylnikowym tytoniu, co powoduje nadmierną wakuolizację i rozrost tapetum oraz zaburzenia w budowie ściany mikrospor (197);
- transformacja roślin za pomocą konstruktorów zawierających geny chimeryczne,
- asymetryczna fuzja protoplastów, tzw. cybrydyzacja, czyli łączenie genomu jądrowego jednego gatunku z genomem cytoplazmatycznym (mitochondria, chloroplasty) drugiego gatunku lub linii genetycznej.

Jedną z metod uzyskiwania mieszańców cytoplazmatycznie męskosterylnych jest

asymetryczna fuzja protoplastów. Polega ona na inaktywacji genomu jądrowego jednego z partnerów, głównie za pomocą promieniowania jonizującego lub gamma. Dzięki tej metodzie można krzyżować przedstawicieli różnych rodzajów, a uzyskane w ten sposób mieszańce noszą nazwę cybrydów (16). Jednym z pierwszych przykładów fuzji asymetrycznej w rodzaju *Nicotiana* jest podstawienie cytoplazmy *N. africana* w genomie *N. tabacum* (107). Metoda ta została wykorzystana również w celu uzyskania mieszańca *N. tabacum* 'K326' × *N. repanda*. Uzyskane formy morfologicznie przypominały tytoń uprawny, ale były męskosterylne. Badania molekularne wykazały, że uzyskane cybrydy oraz potomstwo otrzymane w kolejnych pokoleniach z krzyżowania wstecznego z *N. tabacum* miały jądro pochodzące od *N. tabacum* i cytoplazmę od *N. repanda*. Obecność mitochondrium gatunku dzikiego zostało potwierdzone dzięki użyciu primerów dla mitochondrialnego genu *atpA* specyficznych dla *N. repanda* (172). A t a n a s s o v i i n. w roku 1998 (5) dzięki fuzji asymetrycznej uzyskali mieszańca *N. tabacum* × *N. alata*. Analiza Southern-blot wykazała obecność w cybrydach genomu jądrowego od *N. tabacum* i chloroplastów od *N. alata*. Zastosowanie enzymów restrykcyjnych sugeruje, że genomy mitochondrialne cybrydów pochodzą z rekombinacji obu genomów mitochondrialnych form rodzicielskich. Wspomniana rekombinacja mitochondriów została potwierdzona w badaniach nad cybrydami *N. tabacum* × *N. suaveolens* (71). W roku 1999 D r a g o e v a i i n. (64) uzyskali międzyrodzajowe cytoplazmatycznie męskosterylne cybrydy pomiędzy *N. tabacum* i *Petunia hybryda*. Formy te posiadały morfologię tytoniu. Badania molekularne wykazały obecność genomu jądrowego od *N. tabacum*, chloroplastów od *Petunia hybryda* i zrekombinowane mitochondria posiadające cechy obu rodziców.

Nowoczesne metody badań z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych i analiz hybrydacyjnych z sondami molekularnymi u roślin płodnych i męskosterylnych pozwoliły na identyfikację regionów mtDNA związanych z cechą cms. Analiza genów skorelowanych z męską sternością wykazała, że ich sekwencje nukleotydowe ulegają rearanzacji w regionach kodujących i flankujących. W przypadku niektórych roślin cms zidentyfikowano transkrypcyjnie aktywny, unikalny typ genów, tzw. geny chimeryczne. Są one produktem rekombinacji złożonym z fragmentów sekwencji kodujących lub flankujących podstawowych genów mitochondrialnych i niezidentyfikowanych sekwencji *orf*. Geny chimeryczne mogą odpowiadać za powstanie białek, które zakłócają prawidłowy proces mikrosporogenezy. Badania ekspresji genów mitochondrialnych w roślinach płodnych i sterylnych wskazały na istnienie różnic w strukturze syntetyzowanych cząsteczek RNA, jednak nie wszystkie ujawnione zmiany mają związek z cechą cms. Badania O c z o s z roku 1980 (146) pozwalają wnioskować, że przyczyną powstawania męskiej sterności u tytoniu mogło być osłabione tempo gromadzenia RNA ogólnego i białka w liściach, mniejsza intensywność syntezy rybosomalnego RNA i opóźnione rozpoczęcie przemieszczania do stożka wzrostu łodygi związków niezbędnych do syntezy kwasów nukleinowych oraz białka w organach generatywnych. Badania B e r g m a n a i i n. z roku 2000 (22) nad cytoplazmatycznie męskosterylnymi mieszańcami *N. repanda*

da \times *N. tabacum* dotyczące zawartości ATP i ADP w organach kwiatowych pozwoliły stwierdzić, że pylniki męskosterylne tych gatunków produkują znacznie mniej ATP, a tym samym charakteryzują się obniżoną proporcją ATP/ADP w stosunku do płodnych odpowiedników. Stwierdzono również zmieniony wzorzec transkrypcyjny dla mitochondrialnego genu *atp1* u tytoniu.

Cytoplazmatyczna męska sterylność jest procesem odwracalnym. Mechanizm przywracania płodności roślinom męskosterylnym wiąże się najczęściej ze zmianą ekspresji genów mitochondrialnych warunkujących sterylność pyłku. Proces ten zachodzi przy udziale dominujących restorerów (Rf) i może być wynikiem supresji lub kompensacji sterylnego genomu mitochondrialnego (33, 163). Badania nad przywracaniem płodności wskazują na tzw. restorery jądrowe, czyli specyficzne fragmenty chromosomu odpowiedzialne za odtwarzanie jąderka. Jąderkotwórczy fragment jest najczęściej położony w satelitarnej części chromosomu. U tytoniu prowadzono badania nad restorerami płodności w męskosterylnej formie z cytoplazmą od *N. repanda* i genomem *N. tabacum*. Wprowadzenie do genomu męskosterylnego mieszańca fragmentu jądrowego, pochodzącego od *N. repanda*, spowodowało przywrócenie zdolności do wytwarzania normalnych pylników. Uważa się, że po wprowadzeniu restorera system *N. tabacum* odpowiedzialny za organizację jąderka jest eliminowany przez satelitarny fragment z *N. repanda*, który w rodzimej cytoplazmie znajduje warunki do przywrócenia płodności. Wykazano również, że raz przywrócona płodność jest przekazywana na potomstwo (25, 77, 78, 116).

Jak wspomniano, stosowane w hodowli formy cms pozwalają na ochronę praw autorskich, utrzymanie w czystości genetycznej mieszańców F_1 i większą plastyczność odmian. Ma to bardzo duże znaczenie dla szybkiego reagowania na zaopatrzenie rynku, jak też na pojawiające się nowe rasy i izolaty patogenów. Należy podkreślić, że uzyskane w ostatnich latach w IUNG-PIB odmiany tytoniu charakteryzujące się odpornością na *Chalara elegans* oraz dobrymi cechami plonowania i jakości surowca są męskosterylne (14). Podobnie, uzyskane w roku 2004 przez D o r o s z e w s k ą (58) linie BPA zawierają odporność na PVY pochodzącą od *N. africana* i są potencjalnymi kandydatami do uprawy w przyszłości (rys. 8).



Rys. 8. Męskosterylne kwiaty *N. tabacum* BPA

Źródło: fot. T. Doroszevska, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB..

Formy alloplazmatyczne *N. tabacum* odmiany 'Zamojska 4' w kolekcji IUNG w Puławach.

Lp.	Źródło podstawionej obcej cytoplazmy	Pochodzenie
1	<i>N. amplexicaulis</i>	IUNG Puławy, Polska
2	<i>N. bigelovii</i>	TRB, Harare, Zimbabwe
3	<i>N. debneyi</i>	IUNG Puławy, Polska
4	<i>N. eastii</i>	IUNG Puławy, Polska
5	<i>N. exigua</i>	IUNG Puławy, Polska
6	<i>N. glaca</i>	IUNG Puławy, Polska
7	<i>N. glutinosa</i>	WITIM Krasnodar, Rosja
8	<i>N. goodspeedii</i>	TRB, Harare, Zimbabwe
9	<i>N. knightiana</i>	IUNG Puławy, Polska
10	<i>N. megalosiphon</i>	WITIM Krasnodar, Rosja
11	<i>N. occidentalis</i>	WITIM Krasnodar, Rosja
12	<i>N. plumbaginifolia</i>	WITIM Krasnodar, Rosja
13	<i>N. raimondii I</i>	IUNG Puławy, Polska
14	<i>N. raimondii II</i>	IUNG Puławy, Polska
15	<i>N. suaveolens</i>	TRB, Harare, Zimbabwe
16	<i>N. tabacum</i>	IUNG Puławy, Polska
17	<i>N. undulata</i>	WITIM Krasnodar, Rosja

Źródło: Berbec, 1998 (17).

Markery molekularne roślin i patogenów

Ulepszanie genotypów tytoniu z wykorzystaniem nowoczesnych metod opiera się głównie na prowadzeniu hodowli molekularnej, czyli selekcji pożądanych genotypów na podstawie polimorfizmu markera molekularnego sprzężonego z *loci* określonych cech. Markery wykorzystuje się też do identyfikacji specyficznych sekwencji patogenów wywołujących choroby. Wykorzystywane w hodowli markery, dzięki swoim właściwościom, umożliwiają bardziej precyzyjną i szybką selekcję w porównaniu z innymi metodami oceny. Są to głównie markery odporności na choroby, stresy, niedobory pokarmowe czy też służące rozróżnianiu form cytoplazmatycznej męskiej sterility. Identyfikacja markerów molekularnych patogenów pozwala na szybkie i wysoce wiarygodne wykrycie infekcji, nawet jeśli objawy zewnętrzne choroby nie występują, a także na lepsze poznanie czynników chorobowych, określenie przynależności systematycznej i tym samym skuteczniejsze ich zwalczanie. Wykorzystując odpowiednie metody molekularne możliwe jest zbadanie zmienności genetycznej w obrębie gatunków, podgatunków, ras i szczepów patogenów.

Tabela 2

Zmiany części kwiatowych i pokroju roślin u alloplazmatycznych form *N. tabacum* odm. 'Zamojska 4' w zależności od rodzaju obcej cytoplazmy

	Zmiany morfologiczne	Źródła cytoplazmy
Pylniki	normalny	<i>knightiana, raimondii I, raimondii II</i>
	szczątkowy lub brak	<i>amplexicaulis, glauca, tabacum, megalosiphon, suaveolens</i>
	twory płatkowate	<i>eastii, glutinosa, plumbaginifolia</i>
	twory płatkowate i słupkowate	<i>occidentalis, goodspeedii</i>
	twory słupkowate	<i>exigua, debneyi, bigelovii, suaveolens, undulata</i>
Słupek	normalny	<i>amplexicaulis, eastii, glauca, glutinosa, knightiana, raimondii I, raimondii II, plumbaginifolia, tabacum</i>
	o zmienionej morfologii (normalny lub zniekształcony)	<i>bigelovii, debneyi, exigua, suaveolens, undulata</i>
	zniekształcony	<i>goodspeedii, occidentalis</i>
Zmieniona korona		<i>eastii, glutinosa, plumbaginifolia, goodspeedii, occidentalis, suaveolens</i>
Zmieniony pokrój		<i>debneyi, eastii, exigua, glutinosa, goodspeedii*, megalosiphon*, plumbaginifolia, undulata</i>

* znacznie odbiega od pokroju odmiany 'Zamojska 4'

Źródło: Berbeć, 1998 (17).

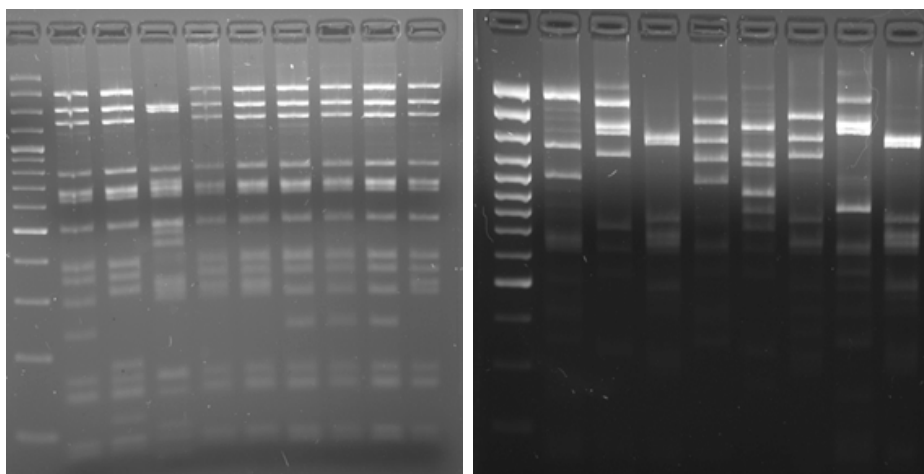
Metody molekularne wykorzystywane do generowania markerów molekularnych można podzielić na dwie grupy. Pierwsza grupa opiera się na wykorzystaniu enzymów restrykcyjnych, a następnie porównywaniu powstałych fragmentów oraz na metodach hybrydyzacji, druga zaś na zastosowaniu łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR ang. *polymerase chain reaction*). Metody oparte na reakcjach PCR odznaczają się wysoką czułością i specyficznością. W ostatnich latach powstało wiele odmian reakcji PCR, np. *nested-PCR* (tzw. wewnętrzny PCR), *multiplex-PCR*, *RT-PCR* czyli PCR poprzedzony procesem odwrotnej transkrypcji, kiedy analizowany materiał genetyczny jest w postaci RNA, *real-time PCR* czyli PCR w czasie rzeczywistym pozwalający na ominięcie etapu identyfikacji DNA w żelu i analizę przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym. Podstawowymi markerami rutynowo wykorzystywanymi w badaniach genetycznych, taksonomicznych i filogenetycznych są markery RFLP, RAPD, SSR, STS i AFLP. Dalsze, liczne modyfikacje metody PCR oraz często połączenie jej z trawieniem restrykcyjnym, doprowadziło do powstania wielu nowych markerów, takich jak np. SCAR, IRAP, REMAP, CAPS.

RFLP, czyli analiza długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragment length polymorphism*) to metoda nie opierająca się na technice PCR,

w której porównuje się wielkości fragmentów DNA wcześniej poddanych trawieniu enzymami restrykcyjnymi. Analiza RFLP może być poprzedzona reakcją PCR (RFLP-PCR). Zróżnicowany obraz prążków po rozdziale elektroforetycznym wynika głównie z mutacji, która objęła miejsce restrykcyjne, bądź delecji lub duplikacji fragmentu DNA pomiędzy miejscami restrykcyjnymi. Jeżeli liczba uzyskanych prążków jest bardzo duża, można rozdzielone w żelu fragmenty DNA poddać denaturacji, przenieść na bibułę nitrocelulozową i przeprowadzić hybrydyzację ze znakowaną sondą. Uzyskuje się charakterystyczny obraz, tzw. profil genetyczny. Markery RFLP mogą być wykorzystywane do konstruowania map genetycznych, wykrywania obcego DNA w tkance roślinnej, (co pozwala na identyfikację czynnika chorobowego w dalszych etapach badań) w badaniach taksonomicznych, filogenetycznych roślin i patogenów czy w identyfikowaniu form cytoplazmatycznej męskiej sterility. Metoda ta znalazła liczne zastosowania w badaniach genetycznych *Nicotiana*, a także patogenów wywołujących różnorodne choroby u tytoniu. G l a s i i n. w roku 1998 (81), badając region odpowiedzialny za charakter nekrotyczny wirusa PVY, który wywołuje brunatną nekrozę nerwów liści tytoniu, zastosowali technikę RFLP do strawienia genomów 10 izolatów PVY będących reprezentantami czterech grup PVY: PVY^N, PVY^{NTN}, PVY^{NW} i PVY⁰. Badania RFLP genomów izolatów, które były amplifikowane w dwóch fragmentach, pozwoliły na podzielenie izolatów na 5 grup (pierwszy fragment: grupa A – PVY^N, grupa B – PVY^{NTN} i PVY^{NW}, grupa C – PVY⁰; drugi fragment: grupa D – PVY^N i PVY^{NTN}, grupa E – PVY⁰ i PVY^{NW}). Poza tym, badania wykazały, że regionem odpowiedzialnym za charakter nekrotyczny jest część 5' wirusowego RNA. Metoda została też wykorzystana w badaniach nad PVY prowadzonych w IUNG-PIB i posłużyła do grupowania genetycznego, a do następnie analizy filogenetycznej izolatów PVY^{NW} i PVY^{NTN} (154, 155) (rys. 9). Oprócz wirusów, tą samą techniką badano także patogeniczne grzyby, m.in. *Phytophthora parasitica*, powodującą zgniliznę pierścieniową podstawy łodygi tytoniu (73) oraz izolaty *Rhizoctonia solani* wyizolowane z tytoniu i wywołujące rizoktoniozę. W ostatnim przypadku amplifikowano techniką PCR geny rDNA wraz z sekwencjami ITS, ponieważ regiony te są jednymi z najbardziej zróżnicowanych *loci*, przeprowadzano analizę ITS-RFLP z różnymi enzymami restrykcyjnymi, a następnie stworzono dendrogramy, na podstawie których oceniano różnorodność genetyczną izolatów (86). Markery RFLP są stosunkowo wysoce polimorficzne i odtwarzalne, występują powszechnie, dziedziczą się w sposób kodominujący, czyli sonda hybrydyzacyjna może zwykle wiązać się z różnymi allelami w jednym *locus*. Dają także możliwość jednoczesnego skreeningu nieograniczonej liczby fragmentów DNA przy zastosowaniu niezmiennionej procedury badawczej. Z drugiej strony technika ta jest pracochłonna i czasochłonna oraz wymaga użycia dużej ilości wysokiej jakości, nieuszkodzonego DNA, dlatego obecnie nie jest już tak powszechnie używana i jest zastępowana przez tańsze i prostsze metody oparte na reakcjach PCR.

Jedną z metod opartych na reakcjach PCR jest łańcuchowa reakcja polimerazy z arbitralnie wybranymi starterami, czyli **RAPD** (ang. *random amplified polymorphic*

DNA). Reakcja jest prowadzona z użyciem jednego startera o dowolnie wybranej sekwencji, przyłączającego się do obu nici matrycy, co prowadzi do powstania wielu fragmentów komplementarnego DNA. Generując te startery nie jest konieczna znajomość sekwencji badanego DNA. Polimorfizm markerów RAPD wynika z reanżacji lub delecji pomiędzy miejscami przyłączenia starterów (189). Zwykle wykonuje się kilka reakcji RAPD z różnymi przypadkowymi starterami, które najczęściej pochodzą z firmy OPERON. Lokalizacja oraz liczba miejsc komplementarnych dla danego startera jest różna, nawet dla organizmów blisko spokrewnionych, co stanowi podstawę do ich różnicowania. Prowadząc analizę porównawczą produktów RAPD z markerami RAPD charakterystycznymi dla danego patogena, oczywiście przy użyciu jednakowych starterów, można w szybki i prosty sposób zidentyfikować sprawcę choroby (187).



Rys. 9. Wzory restrykcyjne po trawieniu DNA genomu wirusa PVY enzymami restrykcyjnymi
Źródło: Przybyś, 2011 (155).

Metody RAPD są stosowane do oceniania genetycznej różnorodności wśród wielu organizmów, w tym bardzo często grzybów patogenicznych. W przypadku bakterii, których genom jest mały, uzyskuje się zwykle zbyt małą liczbę produktów RAPD. Użyto jej między innymi do identyfikacji izolatów grzyba *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, który powoduje u tytoniu zgniliznę pierścieniową podstawy łodygi oraz do odróżniania izolatów patogenicznych od niewywołujących objawów choroby. Wyniki badań patogeniczności różnych izolatów w testach szklarniowych zostały całkowicie potwierdzone metodą RAPD, a na podstawie wygenerowanych markerów utworzono drzewa filogenetyczne i pogrupowano izolaty w odpowiednie klastry. Technika okazała się być czułą i niezawodną metodą szybkiej identyfikacji izolatów grzybowych (198, 199). Badano także różnorodność genetyczną i tworzą drzewa filogenetyczne wielu gatunków rodzaju *Nicotiana* (44, 196). Yu i Lin w 1997 roku (196), wykorzystując 34 arbitralnie wybrane startery, porów-

nawali 18 genotypów tytoniu należących do 9 gatunków sekcji *Tomentosae* i *Alatae*. Na podstawie stworzonych dendrogramów, 18 genotypów *Nicotiana* zostało podzielonych na dwa klastry. Badania potwierdziły także przynależność *N. sylvestris* do sekcji *Alatae*, co było zgodne z klasyfikacją według Goodspeed'a. Z wykorzystaniem techniki RAPD identyfikowano geny odporności na czarną zgniliznę korzeni tytoniu (6) oraz geny odporności na *Peronospora tabacina* powodującego mączniaka rzekomego tytoniu (132). Markery wykorzystano także w konstrukcji map genetycznych (ponieważ RAPD dostarcza dużej liczby markerów) do projektowania na ich podstawie markerów SCAR specyficznych dla danego gatunku. Wadami techniki RAPD jest generowanie dominujących markerów oraz jej duża wrażliwość na warunki prowadzonej reakcji, dlatego wyniki uzyskane przez oddzielne grupy badaczy mogą znacząco różnić się od siebie. Innym ograniczeniem jest brak możliwości rozróżnienia heterozygot od genotypów homozygotycznych (7).

W celu ominięcia ograniczeń związanych z powtarzalnością techniki RAPD opracowano metodę **AFLP**, czyli selektywną amplifikację fragmentów restrykcyjnych (ang. *selective restriction fragment amplification*). AFLP łączy w sobie metodę RFLP z reakcją PCR i polega na powieleniu specyficznych fragmentów restrykcyjnych. W metodzie tej nie jest porównywana długość fragmentów, ale obecność lub brak amplifikacji fragmentów DNA. Do wykrywania fragmentów restrykcyjnych stosuje się amplifikację PCR, a nie hybrydizację metodą Southerna, tak jak w RFLP. Technika ta, podobnie jak RAPD, nie wymaga wcześniejszej charakterystyki sekwencji badanego genomu i jest używana głównie do badań genomów roślin, bakterii i wirusów (184). W pierwszym etapie do fragmentów DNA otrzymanych w wyniku trawienia dwoma enzymami restrykcyjnymi przyłączają się krótkie adaptory. Następuje wstępna selekcja fragmentów w reakcji preamplifikacji ze starterami komplementarnymi do adaptorów i miejsc restrykcyjnych, posiadającymi na końcu 3' nukleotyd selekcyjny. Dzięki nukleotydom selekcyjnym dochodzi do ograniczenia liczby powielanych fragmentów. Właściwa selekcja fragmentów jest prowadzona ze starterami selekcyjnymi, które posiadają na końcu 3' dwa lub trzy dodatkowe nukleotydy selekcyjne (184). Liczba amplifikowanych fragmentów może być modyfikowana poprzez użycie primerów z większą lub mniejszą liczbą selektywnych nukleotydów, przez rodzaj nukleotydów selektywnych, zawartość par GC oraz użycie różnych enzymów. Zależy także od wielkości i złożoności genomu. Pomimo że markery AFLP są przeważnie dominujące, metoda ta jest stosowana m.in. do identyfikacji odmian hodowlanych roślin, do tworzenia bardzo zagęszczonych map u roślin wyższych oraz do identyfikacji i różnicowania populacji roślin i patogenów. Stosując technikę AFLP zbadano m.in. zróżnicowanie genetyczne istniejące w rodzaju *Nicotiana*. Dzięki analizie 46 linii tytoni użytkowych oraz 7 dzikich gatunków z użyciem 8 różnych kombinacji starterów, zaobserwowano wysoki stopień podobieństwa profili AFLP linii użytkowych oraz znacznie większą ilość polimorfizmów wśród gatunków dzikich. Wzajemne porównanie profili AFLP dostarczyło dodatkowych informacji o pochodzeniu *N. tabacum* (158).

Kolejnymi markerami są markery **STS** (ang. *sequence tagged sites*), czyli miejsca znaczone sekwencyjnie. Są to markery w postaci krótkiego regionu DNA o długości 200-300 par zasad i są określane przez sekwencję specyficznych starterów umożliwiających ich amplifikację. W przypadku generowania tych starterów konieczna jest znajomość sekwencji badanego DNA, ponieważ startery są projektowane na podstawie znajomości sekwencji całego fragmentu DNA. Markery STS mają zastosowanie głównie do identyfikacji chromosomów i ich regionów, do konstrukcji map fizycznych, przeszukiwania klonów biblioteki DNA. Funkcjonalny marker STS amplifikuje jeden region genomu i produkuje jeden prążek na żelu elektroforetycznym (1).

Markery mikrosatelitarne, dzięki takim cechom jak: wysoki polimorfizm, rozpoznawanie różnych alleli w jednym *locus*, dziedziczenie kodominujące, wysoka odtwarzalność, powszechność występowania (także w genomach chloroplastów i mitochondriów), położenie specyficzne względem chromosomów oraz wysoka wydajność genotypowania z ich udziałem, stały się popularnymi markerami używanymi w hodowli molekularnej i badaniach genetycznych roślin (99). Do markerów mikrosatelitarnych należą markery **SSR** – proste sekwencje powtarzalne (ang. *simple sequence repeats*), **STR** – krótkie tandemowe powtórzenia (ang. *short tandem repeats*) lub **SSLP** – polimorfizm długości prostych sekwencji (ang. *simple sequence length polymorphism*). Markery te składają się z wielokrotnie powtórzonych sekwencji kilku nukleotydów (od 1 do 5), np. AT, AG, GACA, są rozrzucone w dużej liczbie w genomach eukariotycznych i odznaczają się dużym polimorfizmem wewnątrzgatunkowym. Markery te są generowane z użyciem pary specyficznych, specjalnie zaprojektowanych starterów mających zdolność przyłączania się do unikatowych sekwencji flankujących mikrosatelity. Aby zaprojektować specyficzne startery należy wcześniej zidentyfikować sekwencje flankujące mikrosatelitę przez sekwencjonowanie, dlatego markery te, w przeciwieństwie do markerów RAPD czy AFLP, wymagają wcześniejszej znajomości sekwencji DNA. Markery SSR, podobnie jak markery RFLP, są kodominujące i pozwalają na identyfikację różnych alleli w jednym *locus* SSR. Poza tym, występują zarówno w regionach kodujących, jak i niekodujących oraz odznaczają się wysokim stopniem polimorfizmu długości, dlatego łatwo i w sposób odtwarzalny mogą być identyfikowane w reakcji PCR. Dzięki tym cechom możliwe jest uzyskiwanie jednakowych wyników przez różne grupy badawcze (161). Markery SSR, podobnie jak IRAP czy REMAP, wykorzystuje się głównie do badania różnorodności genetycznej i selekcji genotypów. B i n d l e r i i n. w roku 2011 (23) na podstawie około 5 tysięcy wygenerowanych, nowych markerów mikrosatelitarnych stworzyli także mapę genetyczną tetraploidalnego tytoniu o wysokiej rozdzielczości. Mapa ta pod względem gęstości markerów i rozdzielczości jest porównywalna do map najlepiej scharakteryzowanych genomów rodzaju *Solanaceae*, czyli pomidora i ziemniaka. Oprócz jądrowych SSR (nuSSR), występują także mitochondrialne (mtSSR) oraz chloroplastowe (cpSSR). Te ostatnie zostały odkryte po raz pierwszy u *Nicotiana* (186).

Markery **ISSR**, czyli polimorfizm odcinków DNA pomiędzy mikrosatelitami (ang. *inter simple sequence repeat*), umożliwiają otrzymanie profili genotypów roślin w postaci obrazu wielu prążków, tzw. *fingerprinting* DNA lub „odcisk palca DNA”. Stosowany jest tylko jeden starter o długości 17-18 nukleotydów, posiadający 1-2 nukleotydy selekcyjne na końcu 3', dzięki którym może przyłączyć się w miejscu połączenia mikrosatelity z unikatowym DNA (201). W badaniach polimorfizmu DNA, oprócz sekwencji mikrosatelitarnych, wykorzystywane są też inne sekwencje występujące powszechnie i w dużej liczbie w genomach roślinnych, czyli retrotranspozony. Są to sekwencje powtórzone, rozproszone w krótkich i długich odstępach. Markery **IRAP**, czyli polimorfizm odcinków DNA pomiędzy retrotranspozonami (ang. *inter-retrotransposon amplified polymorphism*), są generowane dzięki zastosowaniu specyficznego startera przyłączającego się do końcowych sekwencji LTR (ang. *long terminal repeats*, długie terminalne powtórzenia). Natomiast markery **REMAP**, czyli polimorfizm odcinków DNA pomiędzy retrotranspozonom a mikrosatelitą (ang. *retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism*), można identyfikować przy zastosowaniu pary starterów: startera specyficznego do sekwencji LTR oraz startera mikrosatelitarnego. W obu technikach polimorfizm jest wykrywany poprzez obecność lub brak produktu reakcji PCR. Brak amplifikacji wskazuje na nieobecność retrotranspozonu w danym *locus* (98). Markery ISSR, IRAP, REMAP odznaczające się wyjątkowym polimorfizmem umożliwiają tworzenie złożonych profili DNA, dlatego często są stosowane do badania zróżnicowania genetycznego między odmianami czy liniami roślin. W pracach związanych z ulepszaniem genotypów tytoniu markery IRAP i ISSR zastosowali Y a n g i i n. w roku 2007 (194), badając szczegółowo różnorodność genetyczną i wzajemne korelacje pomiędzy 118 genotypami tytoniu, należącymi do gatunków dzikich, orientalnych i uprawnych. Przeprowadzone badania pokazały niski poziom zróżnicowania genetycznego między różnymi typami tytoni uprawnych, natomiast zdecydowanie wyższy między gatunkami dzikimi. Pozwoliły także na porównanie pokrewieństwa genetycznego pomiędzy różnymi typami tytoniu charakteryzującymi się odmiennymi cechami jakościowymi ważnymi dla przemysłu.

Markery **SSAP** (ang. *sequence specific amplified polymorphism*, polimorfizm sekwencyjnie specyficznej amplifikacji) powstają dzięki prostej modyfikacji techniki AFLP. Różnicują długość odcinków pomiędzy miejscem integracji retrotranspozonu zawierającym sekwencje LTR, a miejscem restrykcyjnym. Wykorzystywane są dwa startery – AFLP oraz starter przyłączający się do sekwencji LTR. Jest to technika wykorzystywana głównie do profilowania DNA (185).

Inne markery, których generowanie opiera się na sekwencjach mikrosatelitarnych i retrotranspozonowych to, m.in.: **MP-PCR** (ang. *microsatellite primed PCR*, amplifikacja z użyciem starterów mikrosatelitarnych), **IMP** (ang. *inter-MITE polymorphism*, polimorfizm długości odcinków pomiędzy sekwencjami MITE), **RAMP** (ang. *random amplified microsatellite polymorphism*, polimorfizm losowo

amplifikowanych mikrosatelitów), **SAMPL** (ang. *selectively amplified microsatellite polymorphic locus*, selektywnie amplifikowany polimorficzny locus mikrosatelitar-ny), **ERAP** (ang. *exon-retrotransposon amplification polymorphism*, polimorfizm na odcinku egzon-transpozon).

Diagnostyka chorób i patogenów roślin

Metody biologiczne i serologiczne

Ocena zdrowotności roślin opiera się w pierwszym etapie na obecności lub braku objawów chorobowych. Ze względu na mnogość patogenów (wirusy, wiroidy, fitoplazmy, bakterie, grzyby) oraz podobieństwo wielu symptomów chorobowych jest to metoda mało precyzyjna.

Objawy chorobowe mogą występować na całej roślinie, to znaczy mogą być systemiczne lub mogą być zlokalizowane w obrębie wybranych organów, tkanek, grup komórek lub nawet pojedynczych komórek chorej rośliny. Powszechnie wyróżnia się następujące typy objawów chorobowych występujących u roślin: więdnienia, nekrozy, zgnilizny, zrakowacenia, zmiany zabarwienia, zniekształcenia, narośla, rany i wydzieliny (106).

W hodowli tytoniu dużo uwagi poświęca się chorobom wirusowym ze względu na brak ochrony chemicznej. Dokonuje się oceny odporności, m.in. na wirusa Y ziemniaka (*Potato virus Y*, PVY), wirusa brązowej plamistości pomidora (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) oraz wirusa mozaiki tytoniu (*Tobacco mosaic virus*, TMV) (rys. 10), zarówno w warunkach polowych, jak i w ścisłych doświadczeniach szklarniowych po sztucznej inokulacji (57, 82, 147). Obserwacje wykonuje się w kilku terminach, dokumentując wszelkie zmiany na roślinach. W przypadku wirusów możliwa jest sytuacja, gdy mimo braku objawów wirus jest obecny w roślinie. Z tego względu konieczne są dodatkowe badania.

Najdawniej i najpowszechniej używaną metodą wykrywania i identyfikacji wirusów roślin jest test biologiczny. Polega on na wykorzystaniu rośliny wskaźnikowej, o której wiemy, że jest podatna na danego patogena. Zaletą tej metody jest jej prostota oraz czułość. Wadą natomiast – dość długi czas oczekiwania na wyniki (106). L a s k o w s k a i B e r b e ć w roku 2006 (111) wykorzystali test biologiczny w ocenie odporności *N. alata*, *N. sanderae* oraz mieszańców *N. tabacum* 'TB-566' tetra x *N. alata*. Gatunkiem wskaźnikowym była *N. glutinosa*. Inokulacja sokiem z roślin wykazujących reakcję nadwrażliwości po zakażeniu TSWV nie spowodowała u *N. glutinosa* żadnej reakcji chorobowej, co świadczy o braku wirusa. Inokulacja sokiem z roślin mających chlorotyczne plamy powodowała u *N. glutinosa* również chlorotyczne zmiany na liściach. Natomiast porażenie systemiczne rośliny wskaźnikowej wystąpiło, gdy użyto soku z rośliny z systemicznymi objawami.

Rośliny wskaźnikowe stosowane są również w celu odróżnienia blisko spokrewnionych wirusów. Do takich wirusów należą TMV i ToMV (ang. *Tomato mosaic virus*) Sztuczna inokulacja gatunków wskaźnikowych pozwala na identyfikację wirusa ze względu na zróżnicowane objawy. *N. sylvestris* oraz *N. tabacum* 'White Burley' reaguje na TMV systemicznym porażeniem, podczas gdy porażenie ToMV skutkuje jedynie lokalnymi plamami nekrotycznymi (72, 85).



Rys. 10. Objawy chorób wirusowych (od lewej): *Potato virus Y* (PVY), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tobacco mosaic virus* (TMV)

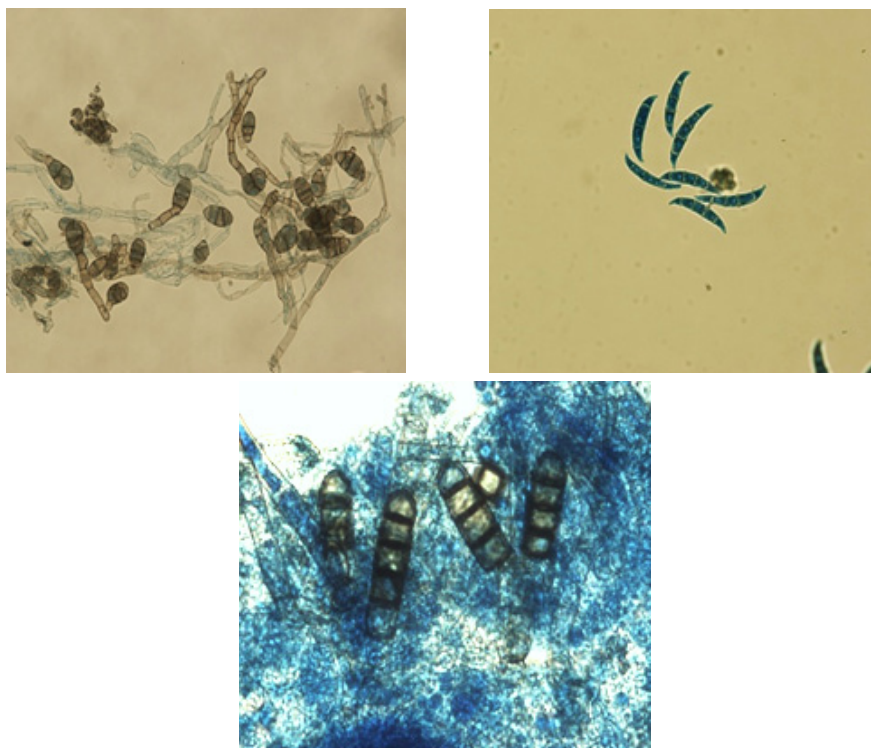
Źródło: fot. T. Doroszevska, A. Depta, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB.

Identyfikacji chorób bakteryjnych oraz grzybowych dokonuje się głównie za pomocą mikroskopu. Przygotowanie preparatu polega na pobraniu fragmentu zmienionej tkanki i obserwacji pod określonym powiększeniem. W przypadku grzybów ocenia się rodzaj grzybni oraz występowanie form przetrwalnikowych (rys. 11).

W celu jednoznacznej identyfikacji patogena wykonuje się testy serologiczne. Analityczne metody immunologiczne wykorzystują specyficzną reakcję między antygenem a przeciwciałem. Jednym z najpowszechniej stosowanych testów w badaniach, zarówno naukowych, jak i diagnostycznych jest test ELISA (41, 114).

Wzmianki o nowych metodach immunoenzymatycznych: teście ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) oraz teście EIA (*Enzyme Immunoassay*) pojawiły się

w latach 60. XX wieku. Zostały odkryte przez dwie niezależne grupy badawcze: Petera Perlmana i Eva Engvall z Uniwersytetu w Sztokholmie oraz Antona Schuursa i Baukea van Weemen z Holandii, a ich rozwój nastąpił w latach 70. i 80. (160). Mimo, iż techniki różniły się od siebie metodyką wykonania, w obu wykorzystano enzymy do wykrywania reakcji antygenów ze swoistymi przeciwciałami. Test ELISA stanowił obiecującą alternatywę dla stosowanych powszechnie testów radioimmunologicznych (*Radioimmunoassay* – RIA), bazujących na szkodliwym dla zdrowia, radioaktywnym znakowaniu (113). Początkowo test ELISA był stosowany do wykrywania przeciwciał w surowicy, jednak za jego pomocą można analizować także ilość antygenów w danej próbce. W wielu publikacjach można odnaleźć informacje dotyczące użycia tego testu w różnych dziedzinach badań, różniące się jedynie metodą wykonania lub wprowadzeniem niewielkich modyfikacji (68). Pierwszą zastosowaną techniką było opłaszczenie antygeny lub przeciwciała na fazie stałej/immunosorbencie. Następnie pojawiły się płytki mikrotrialne. Ten test sprawdzał się przy identyfikacji wirusa HIV u kobiet w ciąży, czy też w wykrywaniu chorób zwierzęcych (69). Prosty, czuły i wszechstronny, stał się podstawowym i fundamentalnym narzędziem w przemyśle farmaceutycznym oraz znalazł zastosowanie



Rys. 11. Choroby grzybowe tytoniu (od lewej):

zarodniki *Alternaria*, zarodniki *Fusarium*, chlamydospory *Thielaviopsis basicola*

Źródło: D. Czarnecka, M. Kawka, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB.

w przemyśle spożywczym, rolnictwie, oraz w różnych testach klinicznych (45, 67, 69, 160). Wykorzystywany jest także do wykrywania specyficznych białek, np. Cry u organizmów modyfikowanych genetycznie (117).

Testy ELISA standardowo wykonywane są na polistyrenowych lub pleksiglasowych, 96-dołkowych płytkach. Płytkę opłaszczą się odpowiednim antygenem lub przeciwciałem. W celu uniknięcia nieselektywnego wiązania się białek do fazy stałej podczas następných etapów testu, wolne miejsca często blokuje się za pomocą buforu blokującego. Łączenie się antygeny ze specyficznym przeciwciałem uwidacznia reakcja barwna, powstająca dzięki enzymom przekształcającym odpowiedni substrat. W teście stosowane są przeciwciała poliklonalne lub monoklonalne. Najczęściej stosowane enzymy to fosfataza alkaliczna, która przekształca bezbarwny fosforan p-nitrofenolu w żółty p-nitrofenol oraz peroksydaza chrzanowa, która daje niebieskie zabarwienie w obecności tetrametylobenzydyny (45). Zmiana barwy roztworu mierzona jest spektrofotometrycznie.

Heterogenną immunoanalizę, jaką jest test ELISA, możemy podzielić na:

1. bezpośrednią,
2. pośrednią,
3. *Double Antibody Sandwich* (DAS-ELISA),
4. *Triple Antibody Sandwich* (TAS-ELISA),
5. kompetencyjną (konkurencyjną).

Bezpośredni test ELISA jest najprostszym ze wszystkich rodzajów tego testu. Pierwszym etapem jest związanie (opłaszczenie) antygeny na płytce. Po okresie inkubacji następuje płukanie w celu usunięcia niezwiązanych antygenów i zablokowanie miejsc nie zajętych przez antygen. Kolejnym etapem jest dodanie znakowanego enzymem przeciwciała specyficznego dla antygeny i inkubacja w celu połączenia antygeny z przeciwciałem. Ponownie płukanie w celu usunięcia niezwiązanych przeciwciał. Antygen połączony ze znakowanym przeciwciałem, po dodaniu substratu odpowiedniego dla enzymy, powoduje reakcję barwną, a intensywność koloru świadczy o ilości badanego białka w próbie.

Pośredni test ELISA stosowany jest do wykrycia obecności przeciwciała. Podobnie jak w metodzie bezpośredniej antygen jest opłaszczony, ale następnie dodawane jest swoiste przeciwciało, które wiąże się podczas inkubacji z antygenem. Dopiero antyprzeciwciało znakowane enzymem, po dodaniu substratu, przekształca się w barwny produkt (45). Zaletą metody pośredniej jest to, że nie trzeba znakować przeciwciał specyficznych względem antygeny przeciwciał. Pozwala to na użycie różnych przeciwciał pierwotnych, bez potrzeby dodatkowych manipulacji związanych z ich znakowaniem, po czym przeciwciała te mogą zostać wykryte za pomocą zawsze takich samych przeciwciał znakowanych

Kolejnym rodzajem jest test kanapkowy ELISA (*Double Antibody Sandwich-ELISA*, DAS-ELISA), gdzie w pierwszym etapie swoiste przeciwciała są opłaszczane w studzienkach płytki. Niezwiązane przeciwciała są usuwane podczas płukania.

Następnie dodawany jest antygen, który reaguje z przeciwciałami. Po inkubacji i płukaniu dodawane jest drugie przeciwciało znakowane enzymem, które wiąże się z unieruchomionym antygenem. Po dodaniu odpowiedniego substratu uzyskuje się reakcję barwną. Szybkość tworzenia barwnego produktu jest proporcjonalna do ilości antygeny (21). W metodzie TAS-ELISA (ang. *Triple Antibody Sandwich-ELISA*) mamy dodatkowe antyprzeciwciało połączone z enzymem (45, 130).

Test kompetencyjny stosowany jest do wykrywania i oznaczania ilościowego antygenów i przeciwciał, które są dostępne w formie oczyszczonej lub wysoce oczyszczonej. Może być przeprowadzany w dwóch wariantach: jako test „z wyłapywaniem antygeny” lub „z wyłapywaniem przeciwciała”. W teście tym wykorzystuje się mieszanke znakowanego antygeny lub przeciwciała, które są dodawane do materiału badanego. Aby dokonać pomiaru stężenia przeciwciał, fazę stałą opłaszczą się odpowiednim antygenem. Następnie na fazę stałą działamy mieszanke badanej surowicy i specyficznego względem danego antygeny przeciwciała monoklonalnego wyznakowanego enzymem. Wówczas następuje współzawodnictwo pomiędzy przeciwciałami w surowicy a przeciwciałami wyznakowanymi. Nieznakowane przeciwciała, obecne w surowicy, będą obniżały proporcjonalnie ilość znakowanych przeciwciał wiązanych przez antygeny połączone z fazą stałą.

Poza wymienionymi rodzajami testu ELISA istnieje jeszcze wiele modyfikacji tej metody, jednakże zasada działania jest podobna.

Test ELISA jest obecnie stosowany na szeroką skalę, umożliwiając wykrywanie i identyfikację wirusów wielu gatunków roślin, w tym tytoniu. Jedną z głównych chorób wirusowych u tytoniu, powodującą brunatną nekrozę nerwów liści, jest wirus Y ziemniaka (PVY). Brunatna nekroza nerwów liści tytoniu jest chorobą o dużym znaczeniu gospodarczym. Pojawianie się nowych izolatów wirusa, zdolnych do przełamywania odporności tytoniu, skłania do poszukiwania źródeł odporności pośród dzikich gatunków rodzaju *Nicotiana*. W IUNG-PIB w Puławach do badań użyto sześciu izolatów należących do trzech grup: PVY^{NW}, PVY^{NZ} i PVY^{NTN} różniących się charakterystyką serologiczną i zdolnością przełamywania 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 (PVY, PVY^N). Badane gatunki uległy porażeniu w różnym stopniu, w zależności od użytego izolatu, wykazując zróżnicowane objawy chorobowe i ich nasilenie oraz zróżnicowane wartości testu ELISA (57). Wirus Y ziemniaka (PVY) jest również jednym z najgroźniejszych wirusów występujących w uprawach ziemniaka. Może porażać także uprawy pomidora, papryki, bakłażana. Objawy na ziemniaku mogą obejmować np. mozaikę widoczną na liściach, drobne lub duże nekrotyczne plamy na liściach, nekrotyczne smugi wzdłuż ogonków liściowych, czy zamieranie całych roślin. Izolaty PVY zgromadzone w kolekcji IHAR-PIB w Młochowie zostały przebadane testem DAS-ELISA. W prowadzonych doświadczeniach wykorzystano tytoń (*N. tabacum*) odmianę ‘Samsun’; pomidora (*Solanum lycopersicum*) odmiany:

‘Rutgers’, ‘Malinowy Ożarowski’, typ Bawole Serce; paprykę (*Capsicum annuum*) odmiany: ‘Alexander’ i ‘Rokita’ jako indykatory. Rośliny zakażano wirusem metodą sztucznej inokulacji. Rośliny badano serologicznie oraz obserwowano objawy. Rośliny wykorzystywane były także do namnażania izolatów do dalszych badań. Do wykrywania izolatów użyto surowicę typu PVY wykrywającą wszystkie izolaty wirusa Y ziemniaka. Do różnicowania izolatów wykorzystano dwie surowice monoklonalne, pierwszą typu PVY^{O/C} wykrywającą izolaty o genie płaszczka typu PVY^O lub PVY^C oraz typu PVY^N wykrywającą izolaty o genie płaszczka typu PVY^N lub PVY^{NA} (83).

Duże zagrożenie dla upraw tytoniu, jak również innych gatunków z rodziny *Solanaceae*, stanowi wirus brązowej plamistości pomidora (TSWV) oraz wirus mozaiki tytoniu (TMV). Zastosowanie metod serologicznych pozwala z jednej strony wskazać rośliny podatne (150), jak również poszukiwać nowych źródeł odporności. W tym celu dokonano sztucznej inokulacji dzikich gatunków *Nicotiana* zgromadzonych w kolekcji IUNG-PIB, a następnie poszukiwano gatunków nie wykazujących objawów i wolnych od wirusa, które mogłyby posłużyć w hodowli odpornościowej (dane niepublikowane).

N. tabacum służy również jako roślina kontrolna przy wykrywaniu wirusów w innych gatunkach roślin. Gatunek ten stanowił roślinę wskaźnikową zastosowaną do wykrywania wirusa mozaiki ogórka (ang. *Cucumber mosaic virus*, CMV) u pelargonii metodą DAS-ELISA. Wyniki testu wykazały pozytywne reakcje na przeciwciała CMV, zarówno u pelargonii, jak i tytoniu (162). Zastosowana metoda DAS-ELISA wykonana została z wykorzystaniem poliklonalnego przeciwciała dla nepowirusów ToRSV (ang. *Tomato ringspot virus*), TRSV (ang. *Tobacco ringspot virus*) i ArMV (ang. *Arabidopsis mosaic virus*) w celu wykrycia ich u roślin ozdobnych (80). *N. tabacum* L. ‘Samsun’ posłużyła jako roślina wskaźnikowa w wykrywaniu wirusa TMV infekującego fiołka afrykańskiego (*Saintpaulia ionantha*). Użyto koniungatu IgG (anti-TMV) znakowanego peroksydazą. Reakcję uwidoczniło przy zastosowaniu substratu σ -fenylojdiaminy (OPD) (171). Natomiast test ACP-ELISA z użyciem poliklonalnych przeciwciał wykorzystano do wykrycia wirusa AMV (ang. *Alfalfa mosaic virus*) u roślin pastewnych. Kontrolę pozytywną stanowiły rośliny *N. glutinosa* oraz *N. tabacum* ‘Samsun’ NN i *N. tabacum* ‘White Burley’, gdzie w przypadku tytoniu szlachetnego poziom adsorbancji był wysoki dla wszystkich izolatów wirusa AMV (131).

Testy ELISA, szeroko rozpowszechnione, niekiedy są niewystarczające i wówczas są wspomagane lub zastępowane przez metody molekularne. Wiąże się to z możliwością wystąpienia reakcji krzyżowej między blisko spokrewnionymi wirusami, co uniemożliwia jednoznaczną identyfikację patogena metodami serologicznymi. Ponadto markery molekularne są znacznie czulszą metodą wykrywania wirusów niż testy ELISA (137).

Metody molekularne-markery odporności

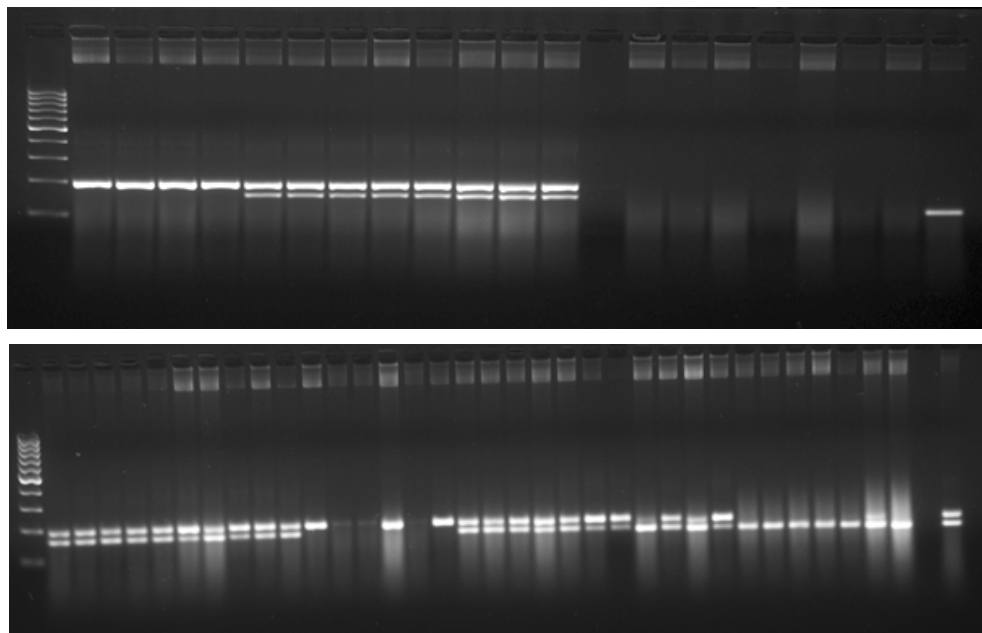
Tworzenie nowych odmian tytoniu o ulepszonym genotypie wymaga monitorowania odporności na czynniki infekcyjne. Metody biologiczne, czyli obserwacja zewnętrznych objawów choroby, czy metody serologiczne nie zawsze pozwalają na prawidłową diagnozę, dlatego w takich przypadkach najskuteczniejsze i niezawodne okazują się metody biologii molekularnej. Uzyskiwanie nowych, odpornych odmian tytoniu metodami klasycznej hodowli, może być znacznie przyspieszone dzięki nowoczesnym metodom biologii molekularnej, m.in. poprzez poszukiwanie markerów odporności na choroby. W części „Markery molekularne roślin i patogenów” zostały wymienione i szczegółowo scharakteryzowane najważniejsze grupy markerów, natomiast tutaj będą omówione markery związane z odpornością na choroby.

Markery molekularne roślin, ściśle powiązane z genami odporności, pozwalają na szybkie i precyzyjne określenie występowania genetycznych podstaw odporności w roślinie i wykluczenie ze wstępnych badań osobników, które takich czynników nie posiadają. Proces poszukiwania markerów molekularnych sprzężonych z genami np. odporności na daną chorobę lub z QTL (ang. *quantitative trait loci*, *loci* cech ilościowych) warunkującymi inne cechy, jest bardzo czasochłonny i wymaga zarówno wiedzy z zakresu biologii molekularnej, genetyki jak i bioinformatyki. Jedną ze strategii jest wykrywanie markera z wykorzystaniem map genetycznych i analiza potomstwa powstałego z krzyżowań linii homozygotycznych o różnych wartościach danej cechy. W tym celu wyprowadzane są tzw. linie blisko izogeniczne, różniące się jedynie allelami w *locus* danej cechy lub, co jest częściej praktykowane i szybsze, prowadzona jest analiza zbiorczych prób segregantów (BSA, ang. *bulk segregant analysis*). Analiza BSA opiera się na otrzymaniu mieszańca F_2 z krzyżowania linii, które różnią się pod względem danej cechy, a następnie wytypowaniu dwóch grup skrajnych po 20 osobników. Następnie prowadzona jest analiza DNA i typowanie markerów identyfikujących różnice między DNA segregantów. Skrajne fenotypy posiadają przeciwstawne allele w *locus* warunkującym daną cechę oraz w *loci* silnie z nim sprzężonymi, oraz te same allele w pozostałych *loci*. Do innych wykorzystywanych strategii należy mapowanie asocjacyjne (ang. *association mapping*), poszukiwanie genu kandydującego (GC) lub bezpośrednio badanie sekwencji dzięki wykorzystaniu automatycznego sekwencjonowania DNA. W poszukiwaniu markerów związanych z odpornością na różne choroby, ale też z innymi ważnymi cechami użytkowymi, powszechnie wykorzystywane są techniki takie jak: AFLP, RAPD, RFLP, SSR czy SSAP. Do tej pory odnaleziono wiele markerów odporności głównie opierając się na technice RAPD np. związanych z czynnikiem odporności na czarną zgniliznę korzeni (6), z dominującym genem „Ph” niosącym odporność na czarną zgniliznę podstawy łodygi (96), czy z genem „Va” warunkującym częściową odporność na nekrotyczny szczep wirusa PVY. W ostatnim przypadku zamplifikowano dziesięć markerów polimorficznych pomiędzy podatną linią BY4, a odporną linią F_{55} , za pomocą pojedynczych i pod-

wójnych starterów użytych w 3500 różnych kombinacjach. Markery te okazały się być silnie sprzężone z *locus* genu warunkującego odporność na PVY i dzięki temu pozwoliły na szybszą selekcję roślin odpornych (142). Technikę AFLP zastosowano natomiast do poszukiwania genów odporności na bakterię *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, atakującą m.in. tytoń. Uzyskano 117 markerów AFLP polimorficznych między odporną linią W6, a odmianą podatną, używając 3072 różnych kombinacji starterów. Markery te następnie były analizowane w liniach podwojonych haploidów powstałych z mieszańców osobników podatnych i odpornych, a na ich podstawie sporządzono mapy wzajemnych sprzężeń. Ostatecznie zidentyfikowano 15 markerów związanych z odpornością na chorobę (141). T o n g i n. w roku 2012 (178) poszukiwali QTL (*loci* cech ilościowych) związanych z odpornością na chorobę grzybową – brunatną suchą plamistość liści tytoniu, wywoływaną przez *Alternaria alternata*. W tym celu otrzymali mieszańce F_2 z krzyżowania linii, które różnią się daną cechą, w tym wypadku podatnością na alternariozę, a następnie skonstruowali mapy genetyczne na podstawie markerów SSR. Rezultatem badań było zmapowanie 3 QTL związanych z odpornością.

Markery AFLP, RAPD, RFLP, SSR czy SSAP zwykle jednak nie sprawdzają się w badaniach selekcyjnych prowadzonych na szeroką skalę, w których liczy się prostota, szybkość i niski koszt. W badaniach selekcyjnych techniki takie jak RAPD czy AFLP służą do wytypowania charakterystycznych fragmentów DNA, które są amplifikowane z największą częstotliwością, a następnie na ich podstawie projektowane są specyficzne startery. Zwykle markery RFLP zamieniane są w markery STS, a markery RAPD, AFLP, SSAP w markery SCAR lub CAPS. Markery **SCAR**, czyli sekwencyjnie charakteryzowany amplifikowany region (SCAR, ang. *sequence characterized amplified region*), odznaczają się wysoką specyficznością, dobrą powtarzalnością i pozwalają wiarygodnie wykrywać polimorfizmy w badanym *locus*. W przeciwieństwie do markerów RAPD czy AFLP, które mogą być niestabilne i występować ze zbyt niską częstotliwością jeśli badania dotyczą większego materiału hodowlanego, markery SCAR idealnie nadają się do hodowli odpornościowej i prowadzenia prac selekcyjnych. Przewaga markerów SCAR nad markerami RAPD wynika z tego, że są one kodominujące, wykrywają pojedyncze *locus*, są identyfikowane w żelu jako wyraźne prążki, są mniej wrażliwe na warunki reakcji oraz odznaczają się większą powtarzalnością. Markery RAPD i AFLP można zamienić w marker SCAR przez wycięcie prążka z żelu, oczyszczenie DNA, wklonowanie w odpowiedni wektor, a następnie zsekwencjonowanie i zaprojektowanie specyficznych starterów. Markery RAPD łatwo zamienić w markery SCAR, ponieważ fragmenty DNA są wielkości od 500 do 1500 bp (8), natomiast markery AFLP, które są wielkości 150-300 bp należy izolować razem z regionami flankującymi (164). Specyficzne markery SCAR na podstawie markerów AFLP, opracowano m.in. dla genów odporności na mączniaka rzekomego tytoniu (wywoływany przez *Peronospora tabacina*), czarną zgniliznę korzeni (wywoływany przez *Thielaviopsis basicola*) i brunatną nekrozę nerwów liści

(wywoływany przez PVY). Markery AFLP generowano z wykorzystaniem 92 genotypów *N. tabacum* L. należących do różnych typów tytoniu. Stosując 11 kombinacji starterów otrzymano 33 polimorficzne fragmenty, które posłużyły do skonstruowania dendrogramów. Po ich analizie wyłoniono 7 fragmentów DNA związanych z trzema różnymi odpornościami: dwa fragmenty związane z odpornością na mączniaka rzekomego tytoniu pochodzącą od *N. debneyi* Domin, dwa z genem *Va* z odpornością na PVY oraz trzy fragmenty powiązane z odpornością na czarną zgniliznę korzeni pochodzącą od *N. debneyi* (97). M o o n i N i c h o l s o n w roku 2007 (136) opracowali 3 markery AFLP SCAR służące do szybkiej i wiarygodnej selekcji genotypów tytoniu niosących gen odporności na brązową plamistość pomidora (TSWV), pochodzący od odmiany ‘Polalta’. Podatną na TSWV odmianę ‘K326’ skrzyżowali z odporną odmianą ‘Polalta’, a następnie, posługując się techniką AFLP oraz analizą zbiorczych prób segregantów, wyłonili markery sprzężone z genem odporności. Przykładem wykorzystania tych markerów są prace hodowlane nad uzyskaniem haploidalnych genotypów tytoniu, łączących w sobie odporność na *Thielaviopsis basicola* i *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Markery umożliwiają szybki screening roślin odpornych (182) (rys. 12).



Rys. 12. Analiza produktów amplifikacji metodą PCR markerów AFLP SCAR związanych z genem odporności na TSWV u tytoniu w żelu agarozowym.

Źródło: fot. K. Kursa, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB.

Markery CAPS (ang. *cleaved amplified polymorphic sequences*) to trawione amplifikowane sekwencje polimorficzne. Na początku amplifikuje się sekwencje DNA,

które wcześniej zostały zmapowane i zsekwencjonowane przy użyciu starterów o unikatowych sekwencjach i w ten sposób uzyskuje się markery STS. Pary starterów są zazwyczaj tak dobierane, aby produkty PCR zawierały introny, ponieważ to zwiększa szanse na znalezienie polimorfizmu. Następnie uzyskane produkty PCR poddawane są trawieniu enzymami restrykcyjnymi i uzyskuje się wzory prążków. Inna nazwa tej metody to PCR-RFLP (105). Dzięki tym markerom możliwe jest ominięcie etapu blottingu DNA i hybrydyzacji przy użyciu sond molekularnych, które występują w technice RFLP (104). Markery CAPS są kodominujące, specyficzne względem danego *locus* i pozwalają na rozróżnienie roślin homozygotycznych od heterozygotycznych dla danej pary alleli (105). Przekształcenie markera RFLP w marker STS polega na zsekwencjonowaniu fragmentu RFLP i zaprojektowaniu pary specyficznych starterów. Kiedy po rozdzielaniu w żelu, brak jest wyraźnego zróżnicowania długości fragmentów DNA uzyskanych w reakcji PCR, można konwertować marker STS w marker CAPS przez trawienie enzymami restrykcyjnymi.

Metody analityczne – klucz do rozwoju produkcji rolniczej

Istotną cechą określającą jakość tytoniu jest skład chemiczny jego liści. Odmieniana zawartość związków chemicznych w surowcu powoduje, że ma on zróżnicowane przeznaczenie użytkowe. Podobnie jak smak, czy aromat, bogaty skład związków w liściach zależy w dużej mierze od odmiany tytoniu oraz sposobu jego uprawy – siedliska, przebiegu pogody, sposobu zbierania, suszenia i preparowania liści (156). Na zmiany zawartości poszczególnych substancji chemicznych w surowcu mają także wpływ infekcje roślin powodowane przez patogeny (bakterie, grzyby, wirusy). Przekierowują one metabolizm komórkowy, co bezpośrednio modyfikuje skład surowca, powodując powstawanie niepożądanych związków (183). Największy problem stanowią wirusy, ponieważ chemiczne ich zwalczanie jest nieskuteczne. Jedyne sposoby walki z nimi to usuwanie wektorów i stosowanie odmian odpornych (58).

Najważniejszymi związkami chemicznymi tytoniu są alkaloidy. Jest to grupa związków występująca głównie w roślinach w postaci soli kwasów organicznych. W swojej budowie zawierają układ cykliczny z co najmniej jednym atomem azotu. Wykazują właściwości zasadowe i mają silne działanie fizjologiczne na organizmy ludzkie i zwierzęce. W ich budowie chemicznej możemy wyróżnić:

pierścień pirydynowy (wszystkie alkaloidy tytoniu)



pierścień piperydynowy (anabazyna, anatabina)



pierścień pirolidynowy (nikotyna, normikotyna, miozmina)

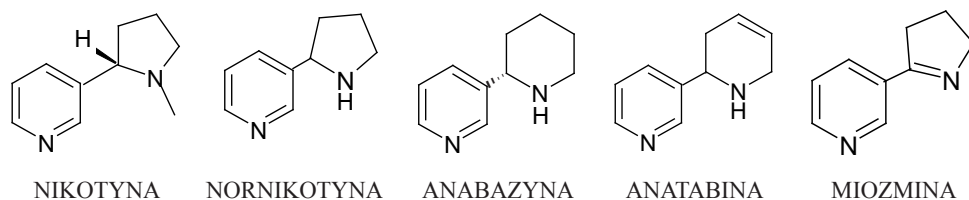


Pierścień pirydynowy pochodzi z kwasu nikotynowego, dlatego wszystkie alkaloidy tytoniu możemy zaliczyć do pochodnych tego kwasu (50). Geneza pierścienia drugiego – piperidynowego, pozwala nam zaliczyć je do pochodnych lizyny, bądź ornityny, ponieważ pierścień ten powstaje w wyniku cyklizacji i dekarboksylacji tych związków. Natomiast pierścień trzeci – pirolidynowy powstaje w podobny sposób, ale z ornityny, proliny lub kwasu glutaminowego (143).

Najważniejszym alkaloidem tytoniu jest nikotyna. Produkowana jest ona przede wszystkim w korzeniach i wraz ze wzrostem rośliny transportowana ksylemem do pozostałych jej części. Alkaloid ten należy do silnych neurotrucizn. Dawka śmiertelna nikotyny zawiera się w granicach 40-60 mg (91). Jest odpowiedzialna za uzależnienie od produktów tytoniowych, ale także coraz częściej wykorzystywana jako substancja wspierająca walkę z różnymi chorobami (nocny bezdech, zespół Tourette'a i zaburzenia koncentracji) (11). W małych dawkach pobudza układ nerwowy, podwyższa ciśnienie tętnicze, a w większych zaburza oddech i pracę serca. Dodatkowo wykazuje właściwości napotne, moczopędne, wymiotne i wykrztuśne (135). Indianie stosowali ją jako środek leczniczy o działaniu przeciwbólowym, przeciwrzucającym, rozkurczającym, łagodzącym ukąszenia owadów i węży (134).

Absorpcja nikotyny zmienia się wraz ze zmianą pH wchłanianego przez palacza dymu tytoniowego – przy pH=5,84 zostaje pochłonięty jedynie 1% nikotyny, natomiast w pH=7,99 następuje wzrost wartości absorpcji tego alkaloidu do 59% (102). O odczynie dymu decyduje między innymi zawartość cukrów w liściach, na co z kolei ma wpływ proces suszenia surowca. Im wolniej są suszone liście tytoniu, tym większa w nich strata cukrów, i tym bardziej alkaliczny jest odczyn dymu. Zwiększanie absorpcji nikotyny przez organizm człowieka, pojawia się także, podczas konsumowania produktów tytoniowych wraz z napojami alkoholowymi (102).

Oprócz nikotyny, tytoń zawiera także takie alkaloidy jak: nornikotyna, anabazyne, anatabina, miozmina, tzw. alkaloidy wtórne (rys. 13).



Rys. 13. Budowa wybranych alkaloidów

Ich stężenie nie jest już tak wysokie, jak stężenie nikotyny. Ilość nornikotyny waha się w granicach 3-5% całkowitej zawartości alkaloidów tytoniowych, podczas gdy nikotyna stanowi ich 90% (34). Główne badania chemiczne skierowane są głównie na określenie zawartości nikotyny i nornikotyny w materiale roślinnym. Dzieje się tak, ponieważ większa zawartość nikotyny powoduje wzrost jakości tytoniu, natomiast

duże stężenie normikotyny – obniża tę jakość. Warto wspomnieć, że procentowe zawartości alkaloidów, mogą znacznie się różnić między poszczególnymi gatunkami (tab. 3):

- *N. rustica* L. może zawierać 5-8 razy więcej nikotyny niż *N. tabacum* (102),
- *N. glauca* zawiera dużo większe stężenie anabazy niż nikotyny, inaczej niż pozostałe odmiany *Nicotiana* (188),
- ciemny tytoń Burley może zawierać nawet 10 razy mniej nikotyny niż inne odmiany *N. tabacum* (36).

Tabela 3

Zawartości poszczególnych alkaloidów w różnych gatunkach i odmianach tytoniu

Nazwa	Stężenie alkaloidów				
	NIKOTYNA [%]	NORNIKOTYNA [ppm]	ANABAZYNA [ppm]	ANATABINA [ppm]	NORNIKOTYNA/ NIKOTYNA [%]
<i>Nicotiana occidentalis</i>	<0,02	210	84	67	94

<i>Nicotiana glauca</i>	<0,02	140	4800	130	65
<i>Nicotiana rustica</i>	0,42	180	54	140	4,2
<i>Nicotiana maritima</i>	<0,02	220	84	86	100
<i>Nicotiana gossei</i>	0,29	5600	52	250	200
‘PBD6’	0,37	99	<20	140	2,7
‘VTA’	0,098	<50	<20	<50	-
‘VAM’	0,123	<50	<20	<50	-
‘VRG2’	0,29	80	<20	120	2,8
‘VRG5’	2,3	1400	160	1600	6,2
‘TN86’	0,191	70	<20	77	3,6
‘Wiślica’	0,35	140	<20	220	4

Źródło: Kursa, wyniki nieopublikowane.

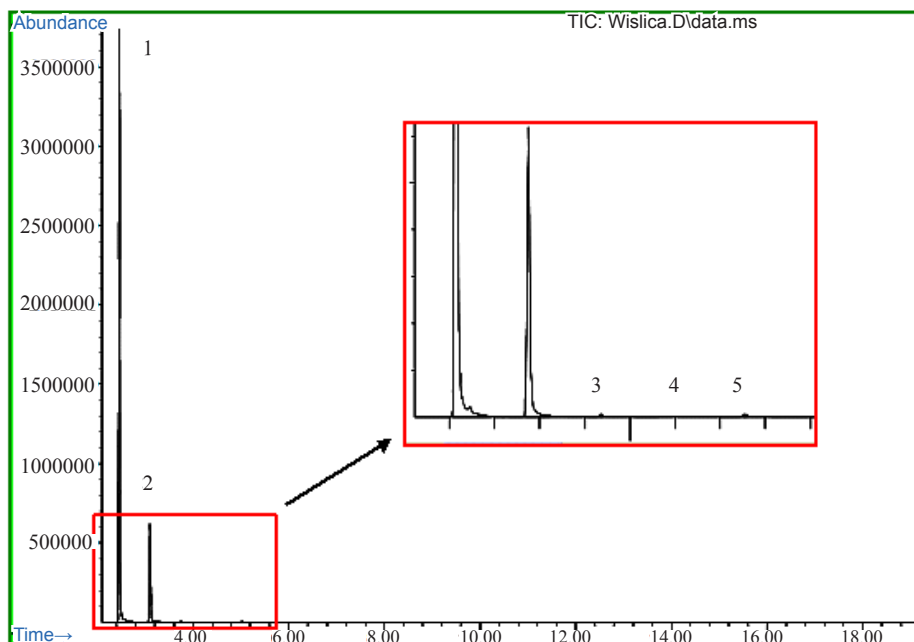
Niestety, wysoka zawartość alkaloidów wtórnych powoduje znaczną redukcję cukrów w surowcu. Dodatkową wadą takich roślin jest fakt, że w czasie zbioru wykazują niższą zawartość chlorofilu w liściach. Cecha ta objawia się intensywnym, żółtym zabarwieniem, co niekorzystnie wpływa na walory wizualne surowca (36).

Rośliny, które gromadzą nikotyne jako ich elementarny alkaloid nazywane są „niekonwerterami” (*nonconverters*), natomiast te, które znaczną część tego al-

kalo-idu przekształcają w nornikotyę, to „konwertery” (*converters*). Proces formowania (konwersji) nornikoty z nikoty, polega na oksydacyjnej N-demetylacji i katalizowany jest przez gen – *CYP82E4*, który ulokowany jest w starzejących się liściach. Jego budowa molekularna nie jest jeszcze jednoznacznie poznana, ale wiadomo, że jest to nietrwały, zmienny *locus* pochodzący z *N. tomentosiformis*. Prawdopodobieństwo, że to właśnie ten gen jest odpowiedzialny za proces konwersji, naukowcy tłumaczą silną korelacją pomiędzy aktywnością genu *CYP82E4*, a zawartością nornikoty. Aktywność ta jest szczególnie wzmożona w trakcie procesu starzenia się liści. W tym samym czasie znacznie wzrasta stężenie wyżej wymienionego alkaloidu wtórnego. Z tego też powodu uważa się, że *CYP82E4* odgrywa kluczową rolę w procesie przemiany nikoty w nornikotyę u tytoniu. W zielonych częściach roślin nornikoty występuje w niewielkiej ilości, a jej obecność najprawdopodobniej warunkowana jest aktywnością genu *CYP82E5v2*, który jest odpowiednikiem *CYP82E4* (34).

Skład chemiczny tytoniu można badać między innymi, przy pomocy chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC–MS) (49). Jest to jedna z najbardziej rozpowszechnionych metod instrumentalnych w chemii analitycznej. Przy jej pomocy można analizować substancje mające w warunkach analizy postać gazów. GC polega na separowaniu analizowanych związków chemicznych na kolumnie chromatograficznej. Rozdzielenie tych składników jest wynikiem różnego ich podziału między fazę ruchomą (gaz nośny) i nieruchomą (wypełnienie kolumny) układu chromatograficznego. Różny rozdział składników mieszaniny pomiędzy obie fazy, powoduje zróżnicowanie prędkości migracji, a w konsekwencji separację składników. Po rozdzieleniu mieszaniny na kolumnie chromatograficznej, poszczególne cząsteczki są jonizowane w spektrometrze mas. Tam rozpadają się na charakterystyczne fragmenty, które mają właściwy dla nich stosunek masy do ładunku (m/z) i są separowane w polu magnetycznym. Zebrane widma masowe porównywane są najczęściej ze znanymi widmami masowymi znajdującymi się w bibliotece.

Analiza materiału metodą GC-MS, pozwala zatem określić jakość zawartych w surowcu związków. Podstawą tej oceny jest sprawdzenie położenia pików na chromatogramie – weryfikacja czasu retencji. Czas ten jest wielkością stałą i charakterystyczną dla określonej substancji w danych warunkach prowadzonego procesu (typ i wypełnienie kolumny, rodzaj gazu nośnego i jego przepływ oraz program temperaturowy). Oprócz analizy jakościowej, możliwe jest także wykonanie oznaczenia ilościowego. O ilości związku w mieszaninie możemy wnioskować na podstawie wysokości i powierzchni odpowiadającego mu pików. Ponieważ wartość wysokości pików stosujemy tylko wtedy, kiedy pik jest wąski i symetryczny (co w praktyce jest rzadkością), dlatego też dużo częściej do analizy ilościowej wykorzystujemy pole jego powierzchni. Istota tego oznaczenia polega na porównaniu wielkości pików badanego związku, z wielkością pików substancji wzorcowej o znanym stężeniu (metoda dodatku wzorca zewnętrznego lub wewnętrznego) (190) (rys. 14 i 15).



Rys. 14. Chromatogram przedstawiający analizę alkaloidów tytoniowych 'Wiślicy' przy zastosowaniu dodatku wzorca wewnętrznego (1 – IS - chinolina):

2 – nikotyna, 3 – nornikotyna, 4 – anabazyna, 5 – anatabina

Źródło: Kursa, wyniki nieopublikowane.

Quant Title : nikotyna
 QLast Update : Tue Jul 03 09:09:48 2012
 Response via : Initial Calibration

Compound	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)
Internal Standards						
1) chinolina	2.458	102	11301533	0.40	mg/ml	0.00
Target Compounds						
2) nikotyna	3.099	84	8139394	1.06	mg/ml	99
3) nornikotyna	3.744	70	51480	0.06	mg/ml	92
4) anabazyna	4.594	84	45701	0.02	mg/ml#	17
5) anatabina	5.019	105	85086	0.10	mg/ml	99

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

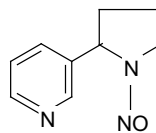
Rys. 15. Raport ilościowy alkaloidów w 'Wiślicy'

Źródło: Kursa, wyniki nieopublikowane.

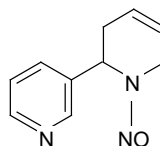
Ważną cechą tej metody analitycznej jest jej szybkość oraz fakt, że może ona być stosowana dla surowca nieprzetworzonego (surowych liści tytoniu) oraz tego pobranego z produktu końcowego (papierosy, snusy).

Poza obecnymi w liściach tytoniu alkaloidami, ogromne znaczenie dla zdrowia człowieka ma także występowanie w nich N-nitrozoamin:

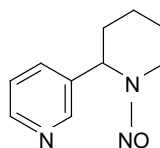
N-nitrozonornikotyina (NNN)



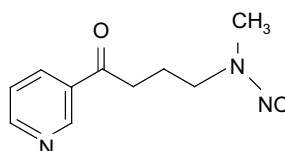
N-nitrozoanatabina (NAT)



N-nitrozoanabazyna (NAB)



4-(metylonitrozoamino)-1-(3-pirydylo)-1-butanon (NNK) (92)



W odpowiednich warunkach następuje konwersja wtórnych alkaloidów tytoniowych do bardziej szkodliwych TSNA (ang. *tobacco-specific nitrosamines*), które nie są związkami pożądanymi w surowcu (40). Powstają one przede wszystkim podczas procesu N-nitrozowania nikotyiny i pozostałych alkaloidów po zebraniu liści, w trakcie ich powietrznego suszenia i fermentacji. Błona komórkowa pęka, a nieszczelne ściany komórkowe pozwalają na wymieszanie zawartości komórki oraz otwierają ją na chemiczne i egzogenne reakcje biotyczne. Azotany (V) zostają zredukowane do azotanów (III) przy udziale mikroorganizmów (53). W Instytucie Tytoniowym w Oyamie w Japonii zbadano, że najniższa zawartość TSNA w liściach jest podczas suszenia ich w stałej temperaturze 50°C. Przy 60°C ilość tych związków znacznie wzrastała, mimo że proces trwał krócej. Natomiast przy 40°C nie widać było żadnych zahamowań w procesie N-nitrozowania (63).

TSNA występują także w dymie papierosowym. Specyficzne dla tytoniu N-nitrozoaminy zostają uwolnione z papierosa podczas jego spalania. Azotyny zawarte w płynach fizjologicznych, w czasie tego procesu, w obecności katalizatora, prowadzą do endogenicznego nitrozowania amin. Ilość uwalnianych związków kancerogennych jednak nie zmniejsza się w trakcie palenia papierosa, tylko ciągle rośnie, ponieważ natychmiast na ich miejsce, w procesie pirosyntezy powstają nowe nitrozoaminy (53).

Do podwyższenia poziomu TSNA przyczynia się także nieodpowiednie przechowywanie tytoniu i jego produktów. Próbkę przechowywaną w temperaturze pokojowej charakteryzują się znacznie zwiększonym poziomem nitrozoamin w porównaniu z przechowywanymi w lodówce i zamrażarce.

Specyficzne dla tytoniu N-nitrozoaminy są składnikami nie tylko suszonych liści, ale także różnych wyrobów tytoniowych np. plastrów, gum do żucia. Jeden papieros zawiera 9-180 ng NNK, 50-500 ng NNN, 3-25 ng NAB oraz 55-300 ng NAT (53). Margines zawartości TSNA w tytoniu jest dosyć szeroki, ponieważ jest on istotnie skorelowany z ilością azotanów znajdujących się w liściu (101). Zielone liście tytoniu nie zawierają nitrozoamin (134) (tab. 4).

Tabela 4

Zawartość poszczególnych nitrozoamin w różnych gatunkach i odmianach tytoniu

Nazwa	Stężenie TSNA			
	NNN [ppm]	NAT [ppm]	NAB [ppm]	NNK [ppm]
<i>Nicotiana occidentalis</i>	0,02	<0,005	<0,003	<0,005
<i>Nicotiana glauca</i>	<0,003	<0,005	0,009	<0,005
<i>Nicotiana rustica</i>	0,020	0,020	<0,003	0,006
<i>Nicotiana maritima</i>	0,004	<0,005	0,004	<0,005
‘PBD6’	<0,003	<0,005	<0,003	<0,005
‘VTA’	<0,003	0,006	0,004	0,030
‘VAM’	<0,003	<0,005	<0,003	<0,005
‘VRG2’	<0,003	<0,005	<0,003	<0,005
‘VRG5’	<0,003	<0,005	<0,003	<0,005
‘TN86’	<0,003	<0,005	<0,003	<0,005
‘Wiślica’	<0,003	<0,005	<0,003	<0,005

Źródło: K. Kurska, wyniki nieopublikowane.

TSNA wykazują silne właściwości rakotwórcze (4, 70). Związki te są odpowiedzialne za występowanie nowotworów jamy ustnej, gardła, krtani i przełyku (87). N-nitrozonornikotylna (NNN) powoduje powstawanie złośliwych nowotworów płuc, a 4-(metylnitrozoamino)-1-(3-pirydylo)-1-butanon (NNK) indukuje powstawanie gruczolaków i gruczolakoraków. Badania wykazały, że najmniej kancerogenna jest nitrozoanatabina (NAT) (53). U palaczy TSNA powodują zmianę profilu lipidowego krwi. Podwyższają zawartość frakcji lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), jednocześnie obniżając ilość frakcji lipoprotein o gęstości dużej (HDL). Zadaniem LDL jest transport cholesterolu z wątroby do tkanek, przez co wzrasta prawdopodobieństwo rozwoju miażdżycy, a także zwiększa się ryzyko choroby wieńcowej. Zmniejszenie zawartości HDL powoduje obniżenie poziomu całkowitego cholesterolu we krwi, poprzez jego transport z tkanek obwodowych i frakcji lipidowych osocza do wątroby (87). Inną funkcją nitrozoamin jest znaczne obniżenie poziomu katalazy i dysmutazy nadtlenkowej – enzymów biorących udział w niwelowaniu wpływu wolnych rodników na organizm człowieka oraz podwyższenie stężenia dialdehydu malonowego – wskaźnika oksydacyjnego uszkodzenia komórek (102).

Określenie składu chemicznego surowca jest niezmiernie ważne, wpływa on bowiem zdecydowanie na jakość wyrobów tytoniowych. Zagadnienie to jest także bardzo istotne dla producentów, którzy wymagają roślin zdrowych, wykazujących szlachetną jakość oraz obfite plonowanie.

Podsumowanie

Prace hodowlane nad tytoniem wyznaczane są przede wszystkim zapotrzebowaniem przemysłu na surowiec o dobrych cechach jakościowych. Niemniej ważne jest dostarczenie rolnikom odpornych odmian, zapewniających stabilne plonowanie i tym samym decydującym o opłacalności produkcji. Tradycyjne metody hodowli są długotrwałe i pracochłonne. Trudności te są stopniowo przewyższane dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod i technik biotechnologicznych, które zostały dokładnie omówione w powyższym rozdziale. Zestawienie metod tradycyjnych z nowoczesnymi wpływa znacząco na postęp w pracach hodowlanych i daje szansę na uzyskanie ulepszonych genotypów tytoniu, zarówno pod względem właściwości rolniczych, jak i jakości surowca. Podsumowując, połączenie nauki i praktyki pozwala osiągnąć zamierzone cele w sposób bardziej celowy, szybszy i dający lepsze rezultaty.

Literatura

1. Agarwal M., Shrivastava N., Padh H.: Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.*, 2008, **27**: 617-631.
2. Almeida A. M., Villalobos E., Araújo S. S., Leyman B., van Dijk P., Alfaro-Cardoso L., Fevereiro P. S., Torné J. M., Santos D. M.: Transformation of tobacco with an *Arabidopsis thaliana* gene involved in trehalose biosynthesis increases tolerance to several abiotic stresses. *Euphy.*, 2005, **146**: 165-176.
3. Anderson E. J., Stark D. M., Nelson R. S., Tumer N. E., Beachy R. N.: Transgenic plants that express the coat protein gene of TMV or AMV interfere with disease development of non related viruses. *Phytopath.*, 1989, **12**: 1284-1290.
4. Andra S. S., Marris K. C.: Tobacco-specific nitrosamines in water: An unexplored environmental health risk. *Environment International*, 2011, **37**: 412-417.
5. Atanassov I. I., Atanassova S. A., Dragoeva A. I., Atanassov A. I.: A new CMS source in *Nicotiana* developed via somatic cybridization between *N. tabacum* and *N. alata*. *Theor. Appl. Genet.*, 1998, **97**: 982-985.
6. Bai D., Reeleder R., Brande J. E.: Identification of two RAPD markers tightly linked with the *N. debneyi* gene for resistance to black root rot of tobacco. *Theor. Appl. Genet.*, 1995, **91**: 1184-1189.
7. Bardacki F.: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turk. J. Biol.*, 2001, **25**: 185-196.
8. Barret P., Delourne R., Foisset N., Renard M.: Development of a SCAR (sequence-characterized amplified region) marker for molecular tagging of the dwarf BREIZH (Bzh) gene in *Brassica napus*. *L. Theor. Appl. Genet.*, 1998, **97**: 828-833.
9. Batchvarova R., Nikolaeva V., Slavov S., Bossolova S., Valkov V., Atanassova S., Guelemerov S., Atanassov A., Anzai H.: Transgenic tobacco cultivars resistant to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Theor. Appl. Genet.*, 1998, **97**: 986-989.

10. Belogradova K., Lewicka I., Heberle-Bors E., Touraev A.: An overview on tobacco doubled haploids. In: Touraev A.: Advances in haploid production in higher plants, Springer-Science+Business Media B.V., 2009, chapter 5.
11. Benowitz N. L.: Pharmacology of nicotine: Addiction and Therapeutics. Annual Rev. Pharmacol. Toxicol. 1996, **36**: 597-613.
12. Berbeć A., Doroszevska T.: Formy tetraploidalne dzikich gatunków *Nicotiana* uzyskane w Zakładzie Hodowli i Uprawy Tytoniu IUNG w Puławach. Pam. Puł., 1991, **99**: 195-204.
13. Berbeć A., Laskowska D.: Investigations of isogenomic alloplasmics of Flue-cured tobacco *Nicotiana tabacum* cv. Wiślica. Beiträge zur Tobakforschung International. Contributions To Tobacco Research, 2005, **21(5)**: 258-263.
14. Berbeć A.: Agrotechnika mieszańcowych odmian tytoniu Virginia. Instrukcja upowszechnieniowa nr 179, IUNG-PIB, Puławy, 2011.
15. Berbeć A.: Chromosome pairing and pollen fertility in the interspecific F₁ hybrids *Nicotiana tabacum* L. x *N. benavidesii* Goodspeed, *N. knightiana* Goodspeed x *N. tabacum*, and *N. raimondii* Macbride x *N. tabacum*. Genetica Polonica, 1987, **28(3)**.
16. Berbeć A.: Cytologiczne morfologiczne i użytkowe właściwości alloplazmatycznych form tytoniu uprawnego *Nicotiana tabacum* L. z cytoplazmą gatunków *N. knightiana* Goodspeed oraz *N. raimondii* Macbride. Rozprawa Habilitacyjna, IUNG, Puławy, 1994.
17. Berbeć A.: Kolekcja alloplazmatycznych cytoplazmatycznie męskojałowych form tytoniu uprawnego *Nicotiana tabacum*. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol., 1998, **463**: 51-61.
18. Berbeć J., Berbeć A.: Growth and development of *Nicotiana tabacum* L. form reconstituted on the cytoplasm of *Nicotiana glauca*. Grah. Genetica Polonica, 1976, **17**. No. **3**
19. Berbeć J., Berbeć A.: Męska jałowość u tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) uzyskana drogą jednoetapowego podstawienia cytoplazmy gatunku *Nicotiana eastii*. Kostoff. Pam. Puł., 1992, **100**: 135-139.
20. Berbeć J.: A cytoplasmic male sterile mutant from of *Nicotiana tabacum* L. Z. Pflzucht., 1974, **73**: 204-216.
21. Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L.: Biochemia, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2009.
22. Bergman P., Edqvist J., Farbos I., Glimelius K.: Male-sterile tobacco displays abnormal mitochondrial atp1 transcript accumulation and reduced floral ATP/ADP ratio. Plant Molecular Biology, 2000, **42**: 531-544.
23. Bindler G., Plieske J., Bakaher N., Gunduz I., Ivanov N., van der Hoeven R., Gandal M., Donini P.: A high density genetic map of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from large scale microsatellite marker development. Theor. Appl. Genet., 2011, **123**: 219-230.
24. Bolsunov I.: New *Nicotiana* amphidiploid as a valuable starting material for the control of virulent blue-mold lines. Int. Tob. Sci. Congr. Sth Hamburg Proc., 1971, 160.
25. Budarf, Pelletier G.: Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. Life Science, 2001, **324**: 543-550.
26. Burk L. G., Gerstel D. U., Wersman E. A.: Maternal haploids of *Nicotiana tabacum* L. Science, 1979, **206**: 585.
27. Burk L. G., Heggested H. E.: The genus *Nicotiana*. A source of resistance to diseases of cultivated tobacco. Econ. Bot., 1966, **20(1)**: 76-88.
28. Burk L. G., Neas M. O.: 4n *N. tabacum* x *N. nudicaulis*. A colchicines induced tetraploid hybrid. Tob. Sci., 1966, **10**: 65-66.
29. Burk L. G.: An interspecific bridge-cross: *Nicotiana repanda* through *N. sylvestris* to *N. tabacum*. J. Hered., 1967, **58**: 215-218.
30. Burk L. G.: Male sterile flower anomalies in interspecific tobacco hybrids. J. Hered., 1960, **51**: 27-31.
31. Burk L. G.: Viable hybrids from monosomics of *N. tabacum* by *N. langsdorfii*. Tob. Sci., 1972, **16**: 43-45.

32. Carlson R. S., Smith H. H., Dearling R. D.: Parasexual interspecific plant hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci., 1972, **69**: 2292-2294.
33. Carlsson J., Leino M., Sohlberg J., Sundström J. F., Glimelius K.: Mitochondrial regulation of flower development. Mitochondrion, 2008, **8**: 74-86.
34. Chakrabarti M., Bowen S. W., Coleman N. P., Meekins K. M., Dewey R. E., Siminszky B.: CYP82E4-mediated nicotine to nornicotine conversion in tobacco is regulated by a senescence-specific signaling pathway. Plant Mol Biol, 2008, **66**: 415-427.
35. Chang T., Chen L., Chen S., Cai H., Liu X., Xiao G., Zhu Z.: Transformation of tobacco with genes encoding *Helianthus tuberosus agglutinin* (HTA) confers resistance to peach-potato aphid (*Myzus persicae*). Transgenic Res., 2003, **12**: 607-614.
36. Chaplin J. F., Weeks W. W.: Association between percent total alkaloids and other traits in Flue-cured tobacco. Reprinted from CROP SCIENCE, May-June 1976, **16**: 416-418.
37. Chaplin J. F.: Use of male sterile tobaccos in the production of hybrid seed. Tobacco Sci., 1962, **8**, 105-109.
38. Chaplin J. F., Mann T. J.: Interspecific hybridization, gene transfer, and chromosome substitution in *Nicotiana*. N. Carolina State Coll. Agr. Exp. Sta. Tech. Bul., 1961, **145**.
39. Chen J. F., Cui L., Malik A. A., Mbiria K. G.: *In vitro* and dihaploid production via unfertilized ovule culture. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 2011, **104**: 311-319.
40. Chen P. X., Qian N., Burton H. R., Moldoveanu S. C.: Analysis of Minor Alkaloids in tobacco. A Collaborative Study, Int., 2005, **21**: 369-379.
41. Clark M. F., Adams A. N.: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. gen Virol, 1977, **34**: 475-483
42. Clayton E. E.: Male sterile tobacco. J. Hered, 1950, **41**: 171-175.
43. Correns C.: Die Vererbung der Geschlechtsformen bei den Gynodiocischen Pflanzern. Ber. Dtsch. Bot. Ges., 1909, **24**: 459-474.
44. Cossirat J. C.: Genetic diversity and varietal identification the species *Nicotiana tabacum* by RAPD markers. Annaesdill Tabacum, 1994, (Section 2), **26**, 1-7.
45. Crowther J. R.: Methods In Molecular Biology The ELISA Guidebook. 2001, 149.
46. Czubacka A., Doroszewska T.: Estimating agronomic traits of transgenic tobacco lines. Euphy., 2010, **172**: 35-47.
47. Czubacka A., Doroszewska T.: Odporność transgeniczných linii tytoniu na wirus Y ziemniaka (PVY). Biotechnologia, 2010, **2(89)**: 72-82.
48. Czubacka A., Doroszewska T.: Uzyskiwanie transgeniczných linii podwojonych haploidów tytoniu metodą kultur tkankowych. Biotechnologia, 2004, **2(65)**: 16-24.
49. Da Graça Lourenço M., Matos A., Conceição Oliveira M.: Gas-liquid chromatographic determination of major tobacco alkaloids, J. Chromat. A, 2000, **898**: 235-243.
50. Dawson R. F.: Biosynthesis of the nicotiana alkaloids. Amer. Sc., 1960, 48: 321.
51. de la Riva G. A., González-Cabrera J., Vázquez-Padrón R., Ayra-Padro C.: *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. J. Biotech., 1998, **1**: 118-127.
52. Delon R., Pelissier B., San L. H., Borrod G., Freyssinet G.: Transgenic tobacco resistant to oxynil herbicides: five years of field experiments. Ann. Tabac., 1993, **25(2)**: 17-26.
53. Desai D., Lin G., Morimoto H., Williams P. G., El-Bayoumy K., Amin S.: Synthesis of (±) [5-³H] N'-nitrosoanatabine, a tobacco-specific nitrosamine. Journal of labeled compounds and radiopharmaceuticals, 2002, **45**: 1133-1141.
54. Doroszewska T., Berbé A.: Chromosome pairing and microsporogenesis in interspecific F₁ hybrids of *Nicotiana africana* with different cultivars of *N. tabacum*. J. Genet. Breed., 1996, **50**: 75-82.
55. Doroszewska T., Berbé A.: Cytogenetic investigation of poliploid interspecific hybrids of *Nicotiana africana* with different cultivars of *N. tabacum*. J. Genet. Breed., 2000, **54**: 77-82.
56. Doroszewska T., Depta A., Czubacka A.: Album gatunków z rodzaju *Nicotiana*/ Album of *Nicotiana* species. IUNG-PIB, Puławy, 2009.

57. Dorosze wska T., Depta A.: Resistance of wild *Nicotiana* species to different PVY isolates. *Phytopathologia*, 2011, **59**: 9-24.
58. Dorosze wska T.: Krzyżowanie oddalone i transformacja genetyczna w uzyskiwaniu odporności tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) na wirusa Y ziemniaka (PVY). Monografie i rozprawy naukowe, 2004, **9**: 7-135.
59. Dorosze wska T.: Możliwości transferu czynników odporności na nekrotyczny szczepek ziemniaczanego wirusa Y (PVY^{NZ}) od *Nicotiana africana* Merxm. Do tytoniu uprawnego. Mat. II Kraj. Symp.: „Odporność roślin na choroby, szkodniki i niesprzyjające czynniki środowiska”. IHAR Radzików, 1995, 77-79.
60. Dorosze wska T.: Przełamywanie barier nieżywności i bezpłodności międzygatunkowych mieszańców *Nicotiana tabacum* L. x *Nicotiana africana* Merxm metodą kultur tkankowych. Pr. Ogr. Bot. PAN, 1994, **5/6**: 465-472.
61. Dorosze wska T.: Transfer of tolerance to different Potato virus Y (PVY) isolates from *Nicotiana africana* Merxm. to *Nicotiana tabacum* L. *Plant Breed.*, 2010, **129(1)**: 76-81.
62. Dorosze wska T.: Uzyskanie stabilnych linii hodowlanych tytoniu z czynnikami odporności na różne izolaty wirusa Y ziemniaka (PVY) od dzikiego gatunku *Nicotiana africana* Merxm. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, 2007, **244**: 273-287.
63. Dorosze wska T.: Wtórne alkaloidy – powstawanie i wpływ na tworzenie nitrozoamin. Opracowanie dla Universal Leaf Tobacco Poland Sp. z o.o. Puławy, 2004.
64. Dragoeva A., Atanassov I., Atanassov A.: CMS due to tapetum failure in cybrids between *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrida*. *Plant Cell, Tissue and Culture*, 1999, **55**: 67-70.
65. Dunwell J. M.: Embryogenesis from pollen *in vitro*. In: *Biotechnology in Plant Science*, Academic Press, 1985, 49-76.
66. East E. M.: Studies on self-sterility. IX. The behavior of crosses between self-sterile and self-fertile plants. *Genetics*, 1928, **17**: 175-202.
67. Engvall E., Perlmann P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 1971, **8**: 871-874.
68. Engvall E., Perlmann P.: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *Immunology*, 1972, **109**: 129-35.
69. Engvall E.: The ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical Chemistry*, 2010, **5**: 319-320.
70. Fant R. V., Henningfield J.E., Nelson R. A., Pickworth W. B.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of moist snuff in humans, *Tobacco control*, 1999, **8**: 387-392.
71. Fitter J., Thomas M. R., Niu C., Rose R.: Investigation of *Nicotiana tabacum* (+) *N. suaveolens* cybrids with carpeloid stamens. *Journal of Plant Physiology*, 2005, **162**: 225-235.
72. Fletcher J. T., MacNeill B. H.: The identification of strains of *tobacco mosaic virus* from tomato crops in Southern Ontario. *Can J. Microbiol*, 1971, **17**: 123-128.
73. Förster H., Oudemans P., Coffey M. D.: Mitochondrial and nuclear DNA diversity within six species of *Phytophthora*. *Exp. Mycol.*, 1990, **14**: 18-31.
74. Gabelman W. H.: Male sterility in vegetable breeding. In: *Genetics in plant breeding*. Brookhaven Symposia on Biology, 1956, 113-122.
75. Gamburg D. L., Wetter L. R.: *Plant tissue culture methods*. National Research Council of Canada. Gaskatoon, 1975, 22-25.
76. Gelwin S. B.: *Agrobacterium* – mediated plant transformation: The biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microb. and Mol. Biol. Rev.*, 2003, **67**: 16-37.
77. Gerstel D. U., Burns L. G., Burk L. G.: A case of cytoplasmic male sterility in *Nicotiana tabacum* and its restoration. *Assoc. South. Biol. Bull.*, 1977, **24**: 53.
78. Gerstel D. U., Burns L. G., Burk L. G.: Cytoplasmic male sterility in *Nicotiana*, restoration of fertility, and the nucleus. *Genetics*, 1978, **89**: 157-169.

79. Gerstel D. U.: Cytoplasmic male sterility in *Nicotiana* (A review). North Carolina Agric. Res. Service Tech. Bul., 1980, 263.
80. Ghotbi T., Shahraneen N.: Natural incidence and infectivity level of three nepoviruses in ornamental crops in Iran. Journal of Plant Breeding and Crop Science, 2009, **1(3)**: 039-044.
81. Glais L., Tribodet M., Gauthier J. P., Astier-Manifacier S., Robaglia C., Kerlan C.: RFLP mapping of the whole genome of ten viral isolates representative of the different biological groups of *Potato Virus Y*. Arch. Virol., 1998, **143**: 2077-2091.
82. Głazewska Z.: Odporność dzikich gatunków *Nicotiana* oraz odmian *N. tabacum* i *N. rustica* na nekrotyczne szczepy wirusa Y. Materiały XVII Sesji Naukowej Instytutu Ochrony Roślin, 1977.
83. Golnik K.: Ocena zróżnicowania szczepów wirusa Y ziemniaka – *potato virus Y* estimation of diversification among strains of *potato virus Y*. 2011 Autoreferat Pracy Doktorskiej.
84. Gopinath D. M., Krishnamurthy K. U., Krishnamurthy A. S.: Cytological studies on interspecific hybrids involving a new Australian species *Nicotiana amplexicaulis*. Can. J. Genet. Cytol., 1966, **7**: 328-340.
85. Green S. K., Hwang L. L., Kyou Y. J.: Epidemiology of *tomato mosaic virus* in Taiwan and identification of strain. J. Plant Dis. Protect. 1987, **94**: 386-397.
86. Gurkanli C. T., Ozkoc I., Gunduz I.: Molecular and conventional identification and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) in Samsun, Turkey. J. Phytopathol., 2009, **157**: 686-696.
87. Güven A., Köksal N., Büyükbese M. A.: Effects of using a different kind of smokeless tobacco on cardiac parameters; 2003, **3**: 230.
88. Harvey P. H., Levings C. S., Wernsman E. A.: The role of extrachromosomal inheritance in plant breeding. Adv. Agron., 1972, **24**: 1-27.
89. Herreera-Estrella W., Simpson J., Martinez-Trujillo M.: Transgenic plants: an historical perspective. Meth. in Mol. Biol., 2005, **286**: 3-32.
90. Horsh R., Fry J., Hoffman N., Eichholtz D., Rogers S., Fraley R.: A simple and general method for transferring genes into plants. Science, 1985, **227**: 1229-1231.
91. Hukkanen J., Jacob III P., Benowitz N.: Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine. Pharmacol. Rev., 2005, **57**: 79-115.
92. Idris A. M., Ibrahim S. O., Vasstrand E. N.: The Swedish Snus and the Sudanese Toombak: are they different? Oral Oncol., 1998, **34**: 558-566.
93. Izuka T., Kuboyama T., Marubashi W., Oda M., Tezuka T.: *Nicotiana debneyi* has a single dominant gene causing hybrid lethality in crosses with *N. tabacum*. Euphytica, 2012, **186**: 321-328.
94. Imamura J., Okabe E., Kyo M., Harada H.: Embryogenesis and plantlet formation through direct culture of isolated pollen of *Nicotiana tabacum* Samsun and *Nicotiana rustica* Rustica. Plant Cell Physiol., 1982, **23**: 713-716.
95. Jacobi V., Bachand G. D., Hamelin R. C., Castello J. D.: Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic tobamoviruses. Journal of Virological Methods, 1998, **74**: 167-178.
96. Johnson E. S., Wolff M. F., Wernsman E. A.: Marker-assisted selection for resistance to black shank disease in tobacco. Plant Dis., 2002, **12**: 1303-1309.
97. Julio E., Verrier J. L., de Borne F. D.: Development of SCAR markers linked to three disease resistances based on AFLP within *Nicotiana tabacum* L. Theor. Appl. Genet., 2006, **112(2)**: 335-346.
98. Kalendar R., Grob T., Regina M., Suoniemi A., Schulman A.: IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. Theor. Appl. Genet., 1999, **98**: 704-711.
99. Kalia R. K., Rai M. K., Kalia S., Singh R., Dhawan A. K.: Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. Euphy., 2011, **177**: 309-334.

100. Kasha K. J.: Haploids from somatic cells. W: Kasha K. J.: Haploids in higher plants. Proceed, 1974, 1.st. Inter. Symp., 67-87.
101. Kavvadias D., Scherer G., Urban M., Cheung F., Errington G., Shepperd J., McEwan M.: Simultaneous determination of four tobacco-specific N-nitrosamines (TSNA) in human urine. Journal of Chromatography B, 2009, **877**: 1185-1192.
102. Killine M., Okur E., Kurutas E. B.: The effects of Maras powder (smokeless tobacco) on oxidative stress in users, Cell Biochem Funct., 2004, **22**: 233-236.
103. Kimber G., Riley R.: Haploid angiosperms. Bot. Rev., 1963, **29**: 480-530.
104. Komori T., Nitta N.: Utilization of CAPS/dCAPS method to convert rice SNPs into PCR-based markers. Breed. Sci., 2005, **55**: 93-98.
105. Konieczny A., Ausubel F. M.: Procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers. Plant J., 1993, **4**: 403-410.
106. Kryczyński S.: Podstawy fitopatologii, 2002, Fundacja Rozwój SGGW.
107. Kumashiro T., Asahi T., Komari T.: A new source of cytoplasmic male sterile tobacco obtain by fusion between *N. tabacum* and X-irradiated *N. africana* protoplasts. Plant Sci., 1988, **55**: 247-254.
108. 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(1)**: 11-18.
109. Laskowska D., Berbeć A.: Nowa męskosterylna linia *Nicotiana tabacum* L. z cytoplazmą *N. wutkei* Clarkson et Symon. Biuletyn IHAR, 2007, **244**: 289-296.
110. Laskowska D., Berbeć A.: Production and characterization of amphihaploid hybrids between *Nicotiana wutkei* Clarkson et Symon and *N. tabacum* L. Euphy., 2012, **183**: 75-82.
111. Laskowska D., Berbeć A.: Resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in *Nicotiana alata* and *N. sanderiae* and in hybrids between *N. tabacum* and *N. alata*. Plant Breeding and Seed Science, 2006, **54**: 91-100.
112. Laskowska D., Berbeć A.: TSWV resistance in DH lines of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from hybrid between 'Polalta' i 'Wiślica'. Plant Breed., 2010, **129**: 731-733.
113. Leng S. X., McElhaney J. E., Walston J. D., Xie D., Fedarko N. S., Kuchel G. A.: Elisa and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. J Gerontol A. Biol. Sci. Med. Sci., 2008, **63(8)**: 879-884.
114. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z.: Mikrobiologia techniczna: Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2008.
115. Lindbo J. A., Dougherty W. G.: Untranslatable transcript of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. Virol., 1992, **189**: 725-733.
116. Linke B., Börner T.: Mitochondrial effects on flower and pollen development. Mitochondrion, 2005, **5**: 389-402.
117. Linkiewicz A., Wiśniewska I., Sowa S.: Molekularne metody wykrywania i identyfikacji organizmów genetycznie zmodyfikowanych (GMO), Biotechnologia, 2006, **3(74)**: 44-52.
118. Linsmaier E. M., Skoog F.: Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 1965, **18**: 100-127.
119. Lloyd R.: Tissue culture as a means of circumventing lethality in an interspecific *Nicotiana hybrid*. Tob. Sci., 1975, **19**: 4-6.
120. Łuniewa M. L.: Hybrids of *Nicotiana alata* with *N. glauca*. Biul. Główn. Bot. Sada Moskwa-Leningrad., 1964, **33**: 27-32.
121. Madanala R., Gupta V., Singh P. K., Tuli R.: Development of chloroplast transformation vectors, and a new target region in the tobacco plastid genome. Plant Biotechnol. Rep., 2012, **6**: 77-87.
122. Maheshwari S. C., Rashid A., Tyagi A. K.: Haploids from pollen grains – retrospect and prospect, Am. J. Bot., 1982, **69(5)**: 865-879.

123. Maheshwari S. C., Tyagi A. K., Malhotra K., Sopory S. K.: Induction of haploidy from pollen grains in angiosperms – the current status. *Theor. Appl. Genet.*, 1980, **58**: 193-206.
124. Majewska - Sawka A., Pląder W.: Transformacja genetyczna komórek roślinnych. W: Malepszy S.: *Biotechnologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2009, 429-454.
125. Majewska - Sawka A., Sadoch Z.: Cytoplazmatyczna męska sterility roślin – mechanizmy biologiczne i molekularne. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych.*, 2003, 52, **4(261)**: 413-423.
126. Majewska - Sawka A.: Otrzymywanie haploidów. W: Malepszy S.: *Biotechnologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2009, 87-99.
127. Maliga P., Breznowitz A. Sz., Marton L.: Streptomycin – resistant plants from callus culture of haploid tobacco. *Nature*, 1973, **244**: 29-30.
128. Marubashi W., Yamada T., Niwa M.: Apoptosis detected in hybrids between *Nicotiana glutinosa* and *N. repanda* expressing lethality. *Planta*, 1999, **210**: 168-171.
129. Melhers G., Labib G.: Somatic hybridisation of plants by fusion of protoplasts. I. Selection of light resistant hybrids of “haploid” light sensitive varieties of tobacco. *Mol. Gen. Genet.*, 1974, **135**: 277-294.
130. Mih A. M., Atiri G. I., Rossel H. W.: Strain-typing of *Potato virus Y* isolates from potato in Nigeria by infectivity tests and ELISA. *African Crop Sci. J.*, 1995, **3(1)**: 99-104.
131. Mih A. M., Hanson J.: Alfalfa mosaic virus: occurrence and variation among isolates from forage legumes in Ethiopia. *Tropical Grasslands*, 1998, **32**: 118-123
132. Milla S. R., Levin J. S., Lewis R. S., Rufty R. C.: RAPD and SCAR markers linked to an introgressed gene conditioning resistance to *Peronospora tabacina* D.B. Adam. in tobacco. *Crop Sci.*, 2005, **45**: 2346-2354.
133. Moav R., Cameron D. R.: The expression of instability in *N. tabacum* x *N. plumbaginifolia*. *Am. J. Bot.*, 1960, **47**: 87-89.
134. Modnicki D.: Turkish (Aztec) Tobacco (*Nicotiana Rustica* L.) unnoticeable danger? *Przegląd lekarski*, 2007, **64**: 10.
135. Moerman D. E.: *Native American ethnobotany*, Timber Press, Portland, Oregon, 1998.
136. Moon H., Nicholson S.: AFLP and SCAR markers linked to *Tomato spotted wilt virus* resistance in tobacco. *Crop Sci.*, 2007, **47**: 1887-1894.
137. Mumford R. A., Barker I., Wood K. R.: The detection of *Tomato spotted wilt virus* using the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 1994, **46**: 303-311.
138. Nicova V., Pundeva R., Petkova A.: *Nicotiana tabacum* L. as a source of cytoplasmic male sterility in interspecific cross with *N. alata*. *Link & Otto. Euphytica*, 1999, **107**: 9-12.
139. Nicova V., Vladova R., Pundeva R., Shabanov D.: Cytoplasmic male sterility in *Nicotiana tabacum* L. obtained through interspecific hybridization. *Euphytica*, 1997, **94**: 375-378.
140. Nielsen M. T., Collins G. B.: Variation among androgenic and gynogenic double haploids of tobacco (*Nicotiana Tabacum* L.). *Euphy.*, 1989, **43**: 263-267.
141. Nishi T., Tajima T., Noguchi S., Ajisaka H., Negishi H.: Identification of DNA markers of tobacco linked to bacterial wilt resistance. *Theor. Appl. Genet.*, 2003, **106**: 765-770.
142. Noguchi S., Tajima T., Yamamoto Y., Ohno T., Kubo T.: Deletion of a large genomic segment in tobacco varieties that are resistant to *Potato virus Y* (PVY). *Mol. Gen. Genet.*, 1999, **262**: 822-829.
143. Nowacki E., Nowacka D.: Biogenetyczna klasyfikacja alkaloidów. *Wiadomości botaniczne*. Tom IX, zeszyt 3, 1965.
144. Oczóś A., Doroszevska T., Laskowska D.: Izolowanie protoplastów z liści tytoniu oraz utrzymywanie ich żywotności. I. Uzyskiwanie materiału do izolacji protoplastów. *Pamiętnik Puławski – Prace IUNG.*, 1988, **93**: 195-205.
145. Oczóś A., Laskowska D., Doroszevska T.: Izolowanie protoplastów z liści tytoniu oraz utrzymywanie ich żywotności. II. Ocena dwu metod izolacji w zastosowaniu do niektórych gatunków *Nicotiana*. *Pamiętnik Puławski – Prace IUNG.*, 1989, **95**: 61-70.

146. O c z o ś A.: Fizjologiczne przyczyny występowania cytoplazmatycznej męskiej sterylności u tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.). Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa. Praca habilitacyjna, 1980.
147. O p o k a B.: Poszukiwanie źródeł odporności na *Lycopersicon virus 3* Smith (*Tomato spotted wilt virus*) w rodzaju *Nicotiana*. Pamiętnik Puławski – Prace IUNG, 1990, 96.
148. P a n d e y K. K., P h u n g M.: Hertwig effect in plants: Induced parthenogenesis through the use of irradiated pollen. *Theor. Appl. Genet.*, 1982, **62**: 295-300.
149. P a n d e y K. K.: Mentor pollen: possible role of wall-held pollen growth promoting substance in overcoming intra and interspecific incompatibility. *Genetica*, 1977, **47**: 219-229.
150. P a r r e l l a G., G o g n a l o n s P., G e b r e - S e l a s s i e K., V o v l a s C., M a r c h o u x G.: An update of the host range of *Tomato spotted wilt virus*. *J. Plant Path.*, 2003, **85**: 227-264.
151. P e l l e t i e r G., B u d a r F.: The molecular biology of cytoplasmically inherited male sterility and prospects for its engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, **18**: 121-125.
152. P ł ą d e r W.: Transformacja plastydów. W: Malepszy S.: *Biotechnologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2009, 448-453.
153. P r z y b o r o w s k i J. A.: Haploidyzacja roślin wyższych i jej zastosowania. *Wiadomości botaniczne*, 1994, **38(3/4)**: 53-62.
154. P r z y b y ś M., D o r o s z e w s k a T.: Genetic grouping of PVY^{NW} and PVY^{NTN} isolates by restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the PCR amplified whole PVY genome. *Acta Bioch. Pol.*, 2009, **56**, Supplement 3/2009: 94.
155. P r z y b y ś M.: Charakterystyka i występowanie wirusa Y ziemniaka (PVY) w głównych rejonach uprawy tytoniu w Polsce. Praca doktorska, IUNG-PIB, Puławy, 2011.
156. R a j e w s k i M.: Rośliny przyprawowe i używki roślinne. PWRiL, Warszawa, 1992.
157. R e e d S., C o l l i n s G. B.: Interspecific hybrids in *Nicotiana* through *in vitro* culture of fertilized ovules *N. stoctonii* x *N. tabacum*, *N. nesophila* x *N. tabacum*, *N. repanda* x *N. tabacum*. *J. Heredity*, 1978, **69(5)**: 311-315.
158. R e n N., T i m k o M. P.: AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. *Genome*, 2001, **44**: 559-571.
159. R o g a l s k a S., M a ł u s z y ń s k a J., O l s z e w s k a M.: Podstawy cytogenetyki roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1999.
160. R u d o l f M. L.: Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 2005, **51**: 2415-2418.
161. S a g h a i M a r o o f M. A., B i y a s h e v R. M., Y a n g G. P., Z h a n g Q., A l l a r d R. W.: Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**: 5466-5470.
162. S a i d i A., S a f a e i z a d e h M.: First Report of Cucumber mosaic virus Infecting Geraniums (*Pelargonium* spp.) in Iran. *Asian J. Plant Path.*, 2011, **5(4)**: 163-165.
163. S c h n a b l e P. S., W i s e R. P.: The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends Plant Sci.* 1989, **3**: 175-180
164. S h a n X., B l a k e T. K., T a l b e r t L.: Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 1999, **98**: 1072-1078.
165. S h a r m a K. K., B h a t n a g a r - M a t h u r P., T h o r p e T. A.: Genetic transformation technology: status and problems. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 2005, **41**: 102-112.
166. S h u k u r o v R. R., V o b l i k o v a V. D., N i k o n o r o v a A. K., K o m a k h i n R. A., K o m a k h i n a V. V., E g o r o v T. A., G r i s h i n E. V., B a b a k o v A. V.: Transformation of tobacco and *Arabidopsis* plants with *Stellaria media* genes encoding novel hevein-like peptides increases their resistance to fungal pathogens. *Transgenic Res.*, 2012, **21**: 313-325.
167. Ś l i w i ń s k a E.: Analiza cyklu komórkowego buraków cukrowych o różnym stopniu ploidalności za pomocą cytometrii przepływowej. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, 1997, **202**: 35-40.
168. Ś l i w i ń s k a E.: Wykorzystanie cytometrii przepływowej w biotechnologii roślin. *Biotechnologia*, 2002, **1(56)**: 122-128.

169. Stoeva P., Yankulova M., Nikolaeva V., Bachvarova R., Ivanova L., Maiss E., Adam G., Valkov V., Guelemerov S., Atanassov A.: Long-term resistance to *Tomato spotted wilt virus* in transgenic tobacco cultivars expressing the viral nucleoprotein gene: greenhouse and field tests. *Mol. Breed.*, 1998, **4**: 155-164.
170. Stoyanova M.: Proučvanija na chibridi mieždu vidovete *Nicotiana tabacum* L. x *N. glauca* Grah. Oddalenna chibridizacija rasteni, 1972, BAN, 127-136.
171. Sulzinski M.A., Jurkonie D.D., Adonizio Ch. S.: Tobacco Mosaic Virus Subliminal Infection of African Violet. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1994, **119**(4): 702-705.
172. Sun Yu-He, Xue Qing-Zhong, Ding Chang-Min, Zhang Xian-Yin, Zhang Li-Li, Wang Wei-Feng, Ali Shaukat.: Somatic cybrization between *Nicotiana tabacum* and *N. repanda* based on a single inactivation procedure of nuclear donor parental protoplasts. *Plant Sci.*, 2005, **168**: 303-308.
173. Swaminthan M. S., Murty B. R.: One way inco incompatibility in some species crosses in the genus *Nicotiana*. *Indian J. Genet. Plant Breed.*, 1957, **17**: 23-26.
174. Tezuka T., Kuboyama T., Matsuda T., Marubashi W.: Possible involvement of genes on the Q chromosome of *Nicotiana tabacum* in expression of hybrid lethality and programmed cell death during interspecific hybridization to *Nicotiana debneyi*. *Planta*, 2007, **226**: 753-764.
175. Tezuka T., Marubashi W.: Apoptotic cell death observed during the expression of hybrid lethality in interspecific hybrids between *Nicotiana tabacum* and *N. suaveolens*. *Breed Sci.*, 2004, **54**: 59-66.
176. Tiernowski M. F., Butenko R. G., Mosiejewa M. E.: The use of tissue culture to overcome the barrier of incompatibility between species and sterility of interspecific hybrids. *Sov. Genet.*, 1974, **8**: 27-33.
177. Tiernowski M. F., Sankareva I. K., Larkina N. I.: Production of interspecific tobacco hybrids by the pollination of ovules *in vitro*. *Sov. Genet.*, 1976, **12**: 1209-1213.
178. Tong Z., Jiao T., Wang F., Li M., Leng X., Ga Y., Li Y., Xiao B., Wu W.: Mapping of quantitative trait loci conferring resistance to brown spot in flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Breed.*, 2012, **131**: 335-339.
179. Touraev A., Vincente O., Heberle-Bors E.: Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci.*, 1997, **2**: 297-302.
180. Trojak-Goluch A., Berbeć A.: Cytological investigations of the interspecific hybrids of *Nicotiana tabacum* L. x *N. glauca* Grah. *J. Appl. Genet.*, 2003, **44**(1): 45-54.
181. Trojak-Goluch A., Berbeć A.: Meiosis and fertility in interspecific hybrids of *Nicotiana tabacum* L. x *N. glauca* Grah. and their derivatives. *Plant Breed.*, 2007, **126**: 201-206.
182. Trojak-Goluch A., Laskowska D., Agacka M., Czarnecka D., Kawka M., Czubacka A.: Effectiveness of combining resistance to *Thielaviopsis basicola* and *Tomato spotted wilt virus* in haploid tobacco genotypes. *Breed. Sci.*, 2011, **61**: 389-393.
183. Verrier J.L., Marchand V., Caillaudeau B., Delon R.: Chemical change and cigarette smoke mutagenity increase associated with CMV-DTL and PVY-N infection in Burley Tobacco. *Inf. Bull., CORESTA, Cape Town*, 2001, **1**.
184. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M.: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 1995, **23**: 4407-4414.
185. Waugh R., McLean K., Flavell A. J., Pearce S. R., Kumar A., Thomas W. T. B., Powell W.: Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (SSAP). *Mol. Gen. Genet.*, 1997, **253**: 687-694.
186. Weising K., Gardner R. C.: A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, 1999, **42**: 9-19.

187. Welsh J., McClelland M.: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**: 7213-7118.
188. Weybrew J. A., Mann T. J.: Comparative composition of certain *Nicotiana* species and their F₁ hybrids with *Nicotian tabacum*. *Tobacco Science* VII, 1963, **8**: 30-38.
189. Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V.: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**: 6531-6535.
190. Witkiewicz Z., Hetper J.: *Chromatografia gazowa*. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2001.
191. Wu Y., Liu X., Zheng Y., Sun S.: Technics of breeding a new transgenic tobacco line and a G28 mutant resistant to potato virus Y – vein necrosis strain. *Inf.Bull. CORESTA*, China, 1999, 13-14.
192. Yamada T., Marubashi W., Niwa M.: Apoptotic cell death induces temperature-sensitive lethality in hybrid seedlings and calli derived from the cross of *Nicotiana suaveolens* x *N. tabacum*. *Planta*, 2000, **211**: 614-622.
193. Yamada T., Marubashi W., Niwa M.: Detection of four lethality types in interspecific crosses among *Nicotiana* species through the use of three rescue methods for lethality. *Breed Sci.*, 1999, **49**: 203-210.
194. Yang B. C., Xiao B. G., Chen X. J., Shi C. H.: Assessing the genetic diversity of tobacco germplasm using intersimple sequence repeat and inter-retrotransposon amplification polymorphism markers. *Ann. of Appl. Biol.*, 2007, **150(3)**: 393-401.
195. Yang H. Y., Zhou C.: *In vitro* induction of haploid plants from unpolinated ovaries and ovules. *Theor. Appl. Genet.*, 1982, **63**: 97-104.
196. Yu Y. L., Lin T. Y.: Construction of phylogenetic tree for *Nicotiana* species based on RAPD markers. *J. Plant Res.*, 1997, **110**: 187-193.
197. Yui R., Iketani S., Mikami T., Kubo T.: Antisense inhibition of mitochondria purvate dehydrogenaze Elalpha subunit in anther tapetum causes male sterility. *Planta J.*, 2003, **34**: 57-66.
198. Zhang X. G., Sun W. X., Guo L., Yu J. F., Chang C. J.: Genetic and pathogenic variation among tobacco black shank strains of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* from the main tobacco growing in China. *J. Phytopath.*, 2003, **151**: 259-266.
199. Zhang X. G., Zheng G. S., Han H. Y., Han W., Shi C. K., Chang C. J.: RAPD PCR for diagnosis of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* isolates which cause black shank on tobacco. *J. Phytopathol.*, 2001, **149**: 569-574.
200. Zhou S., Chen X., Zhang X., Li Y.: Improved salt tolerance in tobacco plants by co-transformation of a betaine synthesis gene BADH and a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene *SeNHX1*. *Biotechnol. Lett.*, 2008, **30**: 369-376.
201. Ziętkiewicz E., Rafalski A., Labuda D.: Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchor polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, **20**: 176-183.

Adres do korespondencji:

mgr Karolina Kursa
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin
IUNG-PIB
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy
tel. 81 886 34 21, w. 551
e-mail: kkursa@iung.pulawy.pl