

WSTĘP

Wirus Y ziemniaka (Potato Virus Y, PVY) stanowi duże zagrożenie dla uprawy tytoniu w Polsce i na świecie. Powoduje brunatną nekrozę nerwów liści tytoniu, która hamuje transport wody i soli mineralnych do liścia, zaś chlorotyczne i nekrotyczne plamy na liściach ograniczają powierzchnię i zdolność asymilacyjną oraz wymianę gazową, a tym samym wzrost roślin (Rys.1). Wirus charakteryzuje się zdolnością do rekombinacji i tworzenia nowych, bardziej zjadliwych szczepów. Odporność na PVY w obrębie odmian uprawnych *Nicotiana tabacum* warunkowana jest przez pojedynczy recesywny gen *va*, będący delecją odcinka sekwencji genu odpowiedzialnego za podatność (*Va*).



Rys.1. Roślina porażona przez wirusa PVY.

CEL

- Ocena podatności wybranych odmian w obrębie kolekcji *Nicotiana tabacum* na wirusa Y ziemniaka.
- Detekcja genu podatności (*Va*) na PVY w badanych odmianach

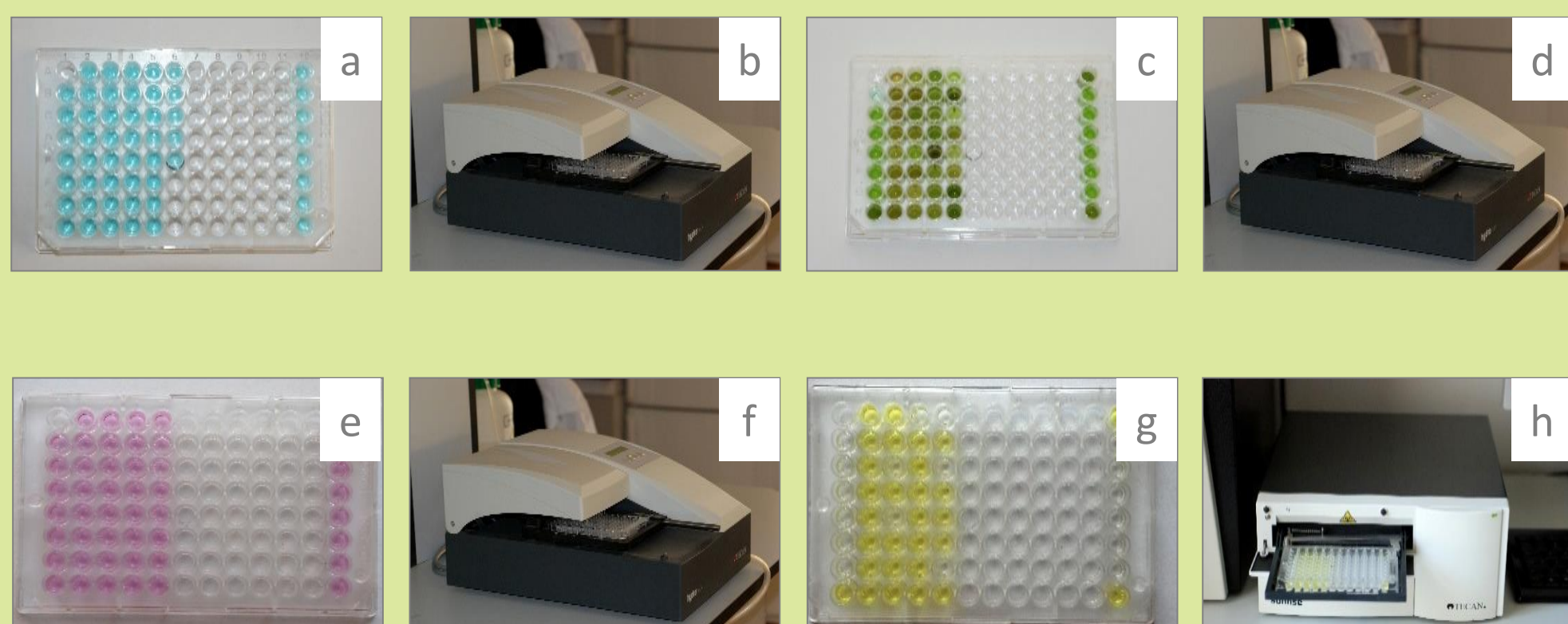
MATERIAŁY I METODY

Materiał badawczy

96 odmian tytoniu należących do różnych grup użytkowych

Testy immunoenzymatyczne

DAS-ELISA z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał anti-PVY (Bioreba) (Rys.2)



Rys.2. Procedura wykonania testów immunoenzymatycznych DAS-ELISA, a – opłaszczanie płytki przeciwciałem, b,d,f – płukanie, c – antygen (z homogenizowaną tkanką roślinną), e – koniugat (przeciwciało sprzężone z fosfatazą alkaliczną), g – substrat (pNPP) zmieniający barwę pod wpływem fosfatazy alkalicznej, h – pomiar absorbancji

Analiza molekularna

- izolacja DNA metodą CTAB
- amplifikacja DNA z wykorzystaniem specyficznych primerów wykrywających gen podatności (*Va*) na PVY
- elektroforeza na 2% żelu agarozowym

WYNIKI



Rys. 3. Objawy porażenia tytoniu przez wirusa Y ziemniaka: a - przejaśnienia nerwów, b - plamy chlorotyczne, c - nekrozy nerwów.

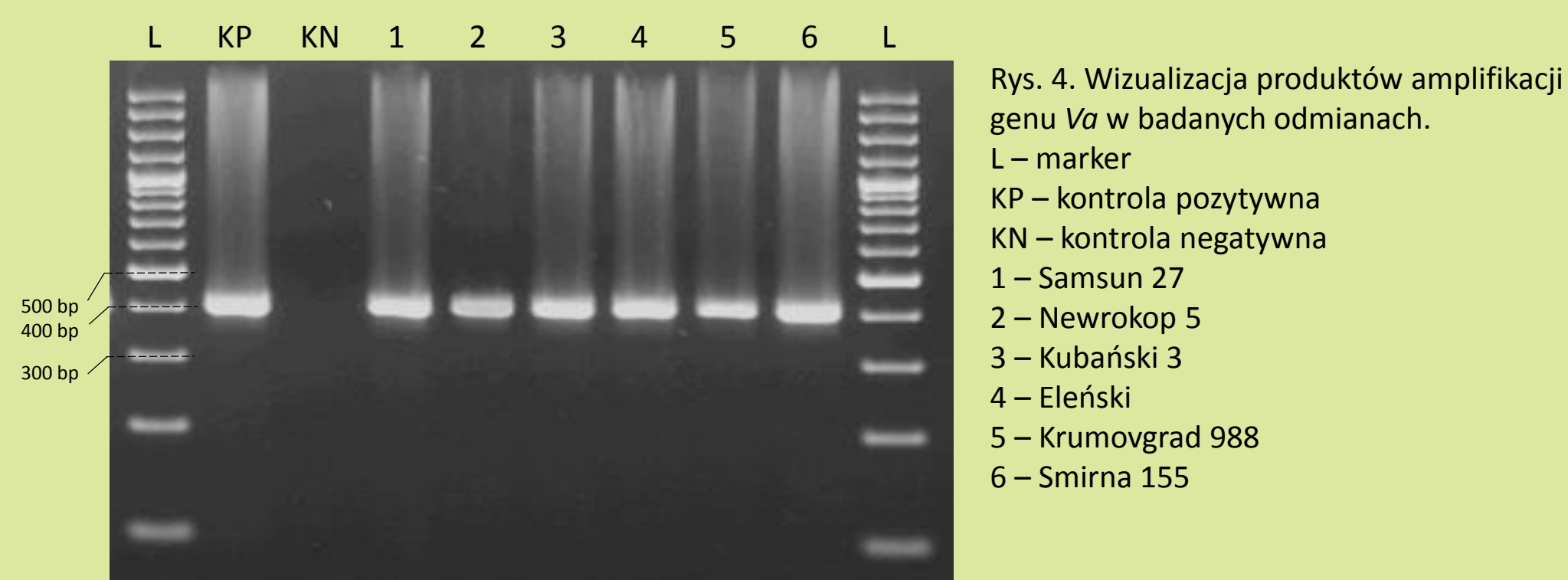
W obrębie grupy tytoni orientalnych wszystkie odmiany zostały porażone przez PVY, co zostało potwierdzone pozytywnym wynikiem testu DAS-ELISA. Wśród objawów obserwowanych na roślinach, jedynie u trzech odmian wystąpiły łagodniejsze symptomy tj. plamy chlorotyczne i przejaśnienia nerwów. Pozostałe rośliny wykazały nekrozy nerwów. W grupie tytoni papierosowych jasnych nekrozy nerwów zaobserwowano na 27 odmianach, zaś przejaśnienia nerwów oraz plamy chlorotyczne na 13 (Rys.3). Sześć odmian nie wykazało objawów chorobowych i dało negatywny wynik testów immunoenzymatycznych. W grupie tytoni papierosowych ciemnych nekrozy nerwów wystąpiły u 17 odmian, a 2 odmiany miały jedynie przejaśnienia nerwów i plamy chlorotyczne. Brak objawów chorobowych i negatywny wynik testów DAS-ELISA wykazano dla 11 odmian (Tab.1).

Tab. 1. Objawy chorobowe na badanych odmianach tytoniu potwierdzone testem DAS-ELISA

Typ użytkowy	Liczba odmian						z obecnością genu <i>Va</i>
	badanych	z objawami PVY			wynik ELISA		
		bo	VC/CS	VN	+	-	
orientalne	21	-	3	18	21	0	21
Papierosowe jasne	45	6	12	27	40	6	42
Papierosowe ciemne	30	11	2	17	19	11	21

bo – brak objawów chorobowych; VC – przejaśnienia nerwów (ang. Vein Clearing); CS – chlorotyczne plamy (ang. Chlorotic Spots); VN – nekrozy nerwów (ang. Vein Necrosis)

Zidentyfikowano łącznie 13 odmian posiadających odporność typu *va* na wirusa Y ziemniaka, w tym 4 w grupie papierosowych jasnych i 9 w grupie papierosowych ciemnych. Wszystkie badane odmiany w typie orientalnym dały pozytywny wynik analiz molekularnych, (Rys. 4.) co świadczy o obecności genu podatności *Va*.



Rys. 4. Wizualizacja produktów amplifikacji genu *Va* w badanych odmianach. L – marker, KP – kontrola pozytywna, KN – kontrola negatywna, 1 – Samsun 27, 2 – Newrokop 5, 3 – Kubański 3, 4 – Eleński, 5 – Krumovgrad 988, 6 – Smirna 155