



Odporność transgenicznych linii tytoniu na wirus Y ziemniaka (PVY)

Anna Czubacka, Teresa Doroszevska

Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin,
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
– Państwowy Instytut Badawczy, Puławy

Resistance of transgenic tobacco lines to *Potato Virus Y*

Summary

Potato virus Y (PVY) causes a disease which reduces the quality of raw material as well as the yield. This study on resistance included tobacco transgenic lines belonging to four cultivars modified with three genetic constructions, containing *Lettuce mosaic virus* coat protein gene (LMV CP) and PVY replicase gene used in sense (ROKY1) and antisense (ROKY2) orientation. The plants were inoculated with PVY isolates under greenhouse conditions and tested by DAS-ELISA. The highest effectiveness of antiviral protection was noticed in case of the lines with transgene LMV CP, lower for ROKY2, and the lowest for ROKY1. In following generations, the percentage increase of a number of plants resistant to PVY was observed within the lines containing transgene LMV CP. Cultivar MN 944 showed to be the best genetic background for that transgene, while cultivar AC Gayed for transgene ROKY.

Key words:

transgenic tobacco, *Potato virus Y* (PVY), *Lettuce mosaic virus* coat protein gene, PVY replicase gene.

Adres do korespondencji

Anna Czubacka,
Zakład Hodowli
i Biotechnologii Roślin,
Instytut Uprawy
Nawożenia
i Gleboznawstwa –
Państwowy Instytut
Badawczy,
ul. Czartoryskich 8,
24-100 Puławy;
e-mail:
annacz@iung.pulawy.pl

biotechnologia

2 (89) 72–82 2010

1. Wstęp

Choroby wirusowe są istotnym problemem w hodowli i uprawie tytoniu, głównie z powodu braku możliwości skutecznego ich zwalczania metodami chemicznymi (1). Dlatego poszukuje się bardziej skutecznych i trwałych sposobów ochrony roślin przed wirusami.

W celu ochrony upraw tytoniu przed PVY prowadzone są badania prowadzące do wyhodowania odmian odpornych. Hodowla odpornościowa opiera się na mutacjach spontanicznych bądź indukowanych, krzyżowaniu międzyodmianowym oraz międzygatunkowym ze spokrewnionymi gatunkami dzikimi (2,3) stanowiącymi naturalne źródła odporności. Krzyżowanie międzygatunkowe nastęrcza jednak szereg trudności związanych z istnieniem barier krzyżowalności. Ponadto w wyniku krzyżowania dochodzi do przeniesienia, oprócz pożądaney cechy, szeregu niekorzystnych cech, które muszą być wyeliminowane w drodze selekcji, co często nie jest łatwe z uwagi na występujące sprzężenia. Alternatywę dla hodowli klasycznej stanowi transformacja genetyczna roślin. Metoda transgenizacji pozwala na stosunkowo szybką i precyzyjną modyfikację genomu poprzez wzbogacenie go o wybraną sekwencję DNA, co nie powoduje tak dużych zmian jak w przypadku mieszańców międzygatunkowych. Dzięki temu droga prowadząca do uzyskania stabilnych odmian odpornych jest krótsza. Transformacja genetyczna roślin pozwala ponadto na włączenie do genomu biorcy genów pochodzących z organizmów odległych filogenetycznie, tj. niespokrewnionych gatunków roślin, zwierząt oraz mikroorganizmów. Celem badań, których wyniki stanowią przedmiot pracy, była analiza ekspresji transgenów w pokoleniach roślin transgeniczných oraz porównanie skuteczności zastosowanych trzech konstrukcji genowych w ochronie tytoniu przed najważniejszymi gospodarczo izolatami wirusa Y ziemniaka.

2. Materiał i metody

2.1. Materiał badawczy

Materiałem wyjściowym były transgeniczne linie tytoniu czterech odmian: Mac Nair 944 (MN 944), K 326, BY 103 i AC Gayed, które należą do typu papierosowego jasnego i charakteryzują się dobrymi cechami jakościowymi, lecz wykazują dużą podatność na PVY. Rośliny transgeniczne zawierały następujące transgeny: LMV CP gen białka płaszczu wirusa mozaiki sałaty (4), skrócony gen polimerazy cDNA wirusa PVY w orientacji sensowej (ROKY1) oraz w orientacji antysensowej (ROKY2) (5). Konstrukcje te były sprzężone z pełniącym rolę markera selekcyjnego genem fosfotransferazy neomycynowej (NPT II) warunkującym oporność na kanamycynę. W obrębie odmiany MN 944 badano linie MN 944 LMV CP, MN 944 ROKY1, MN 944 ROKY2 zawierające konstrukcje odpowiednio LMV CP, ROKY1 i ROKY2; w obrębie odmiany K 326: linie K 326 LMV CP, K 326 ROKY1 i K 326 ROKY2; w obrębie odmiany BY 103: linie BY 103 LMV CP, BY 103 ROKY1 i BY 103 ROKY2, a w obrębie odmiany AC Gayed: linie AC Gayed ROKY1 i AC Gayed ROKY2. W badaniach uwzględniono pokolenia T₂-T₄ linii transgeniczných. Obiekty kontrolne w badaniach odpornościowych stanowiły nietransformowane odmiany MN 944, K 326, BY 103 i AC Gayed.

2.2. Hodowla *in vitro*

Nasiona roślin transgenicznych sterylizowano w 10% roztworze nadtlenu wodoru przez 20 min, a następnie płukano trzykrotnie w sterylnej wodzie destylowanej, wysiewano na pożywkę Linsmayer i Skoog (LS) (6) z kanamycyną w stężeniu 50 mg/l, co pozwalało na wstępne wyselekcjonowanie roślin zawierających transgen. Siewki przenoszono na pożywkę LS z dodatkiem 0,2 mg/l NAA i 0,2 mg/l IAA. Aby dokonać oceny odporności na trzy izolaty PVY, rośliny, w których stwierdzono obecność transgenu rozmnażano wegetatywnie w warunkach *in vitro*. Pobierano wierzchołek wzrostu lub pęd z kąta liściowego rośliny i pasażowano na pożywkę ukorzeniającą LS w celu uzyskania trzech klonów tej samej rośliny. Ukorzone rośliny adaptowano do warunków szklarniowych.

2.3. Analiza obecności transgenów

Z roślin transgenicznych izolowano genomowe DNA, a detekcję transgenu prowadzono stosując reakcję PCR (1,7). W przypadku linii transformowanych konstrukcją LMV CP amplifikowano fragment o długości 834 bp, natomiast w roślinach z transgenem ROKY1 lub ROKY2 identyfikowano fragment o długości 390 bp. Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 1,2% żelu agarozowym z dodatkiem 0,2 µg/ml bromku etydyny. W kierunku obecności transgenu w obrębie każdej linii badano przeciętnie 30 roślin, z których ok. 20 pozytywnych poddawano testom odpornościowym.

2.4. Badania odporności na PVY

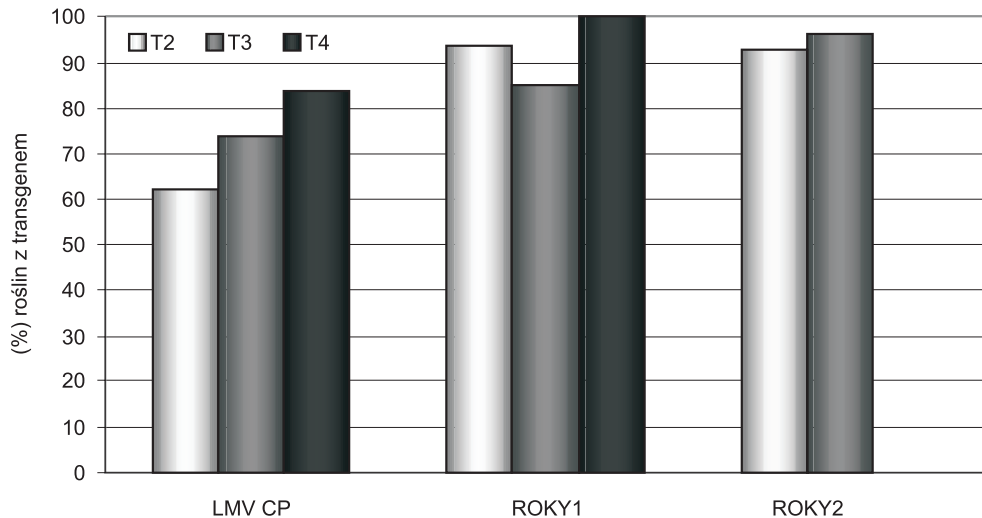
Badania odpornościowe w kierunku PVY wykonano metodą inokulacji w kontrolowanych warunkach szklarniowych, po czym prowadzono systematyczne obserwacje objawów chorobowych, a rośliny bezobjawowe poddawano testom ELISA (7). Każdy z trzech uzyskanych klonów roślin transgenicznych zakażano poszczególnym izolatem PVY. Uwzględniono trzy nekrotyczne izolaty wirusa Y ziemniaka: PVY^{NW} (pozyskany z podatnej odmiany tytoniu), PVY^{NTN}Pu (pozyskany z męskosterylnej odmiany tytoniu Wiślica w Puławach), Y^{NTN}Gr (pozyskany z tytoniu odmiany Agricola w Grudziądzu). Izolat Y^{NW} występuje w przeważającej mierze w warunkach naturalnej infekcji polowej na tytoniu i ziemniaku. Wykrywalny jest przez przeciwciała monoklonalne firmy Bioreba wykrywające wszystkie szczepy PVY, natomiast nie jest wykrywalny przez przeciwciała monoklonalne dla typowych szczepów nekrotycznych, pomimo nekrotycznego charakteru wywoływanych przez niego objawów. Szczep Y^{NW} rzadko przełamuje odporność odmian uznawanych za odporne. Izolaty Y^{NTN}Pu i Y^{NTN}Gr należą do szczepu określanego jako Y^{NTN}, mają zdolność wywo-

lywania nekroz na bulwach ziemniaka. Są wykrywalne przez dwa rodzaje przeciwciał firmy Bioreba oraz przełamują odporność większości krajowych i zagranicznych odmian tytoniu.

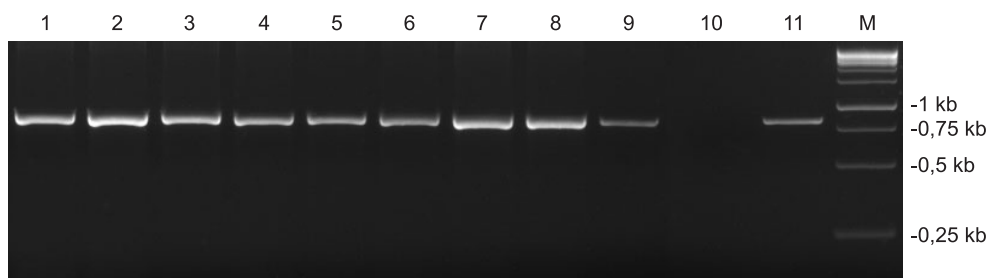
3. Wyniki

Udział roślin zawierających gen białka płaszcz wirusa LMV wyraźnie wzrastał z pokolenia na pokolenie, co świadczy o stabilnym dziedziczeniu transgenu. W pokoleniu T₂ 62% roślin zawierało konstrukcję LMV CP, a w pokoleniu T₄ o 21% wzrósł udział roślin z transgenem (rys. 1). Wzrost procentowej liczby roślin transgenicznych, choć nie tak znaczny, zanotowano także na podstawie analizy dwóch pokoleń roślin transformowanych konstrukcją ROKY2. Natomiast niewielki spadek liczebności roślin z transgenem obserwowano wśród linii transformowanych konstrukcją ROKY1 w pokoleniu T₃. Wyniki detekcji transgenów w roślinach przedstawiono na rysunkach 2 i 3.

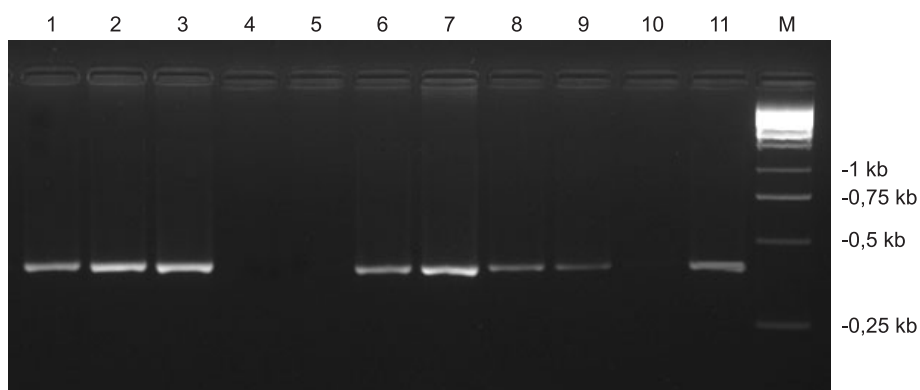
Objawy porażenia roślin wirusem Y ziemniaka widoczne były jako chlorotyczne plamy na liściach, przejaśnienia oraz nekrozy nerwów. Wszystkie rośliny w obrębie odmian kontrolnych zareagowały nekrozami nerwów i blaszki liściowej niezależnie od rodzaju użytego izolatu PVY. Odporne rośliny transgeniczne nie wykazywały objawów. W przypadku roślin transformowanych konstrukcją LMV CP stopniowy wzrost procentowego udziału roślin zawierających transgen w kolejnych pokoleniach przekładał się na wzrost odporności na użyte izolaty PVY (tab. 1), co oznacza, że stabilizacja dotyczyła również cechy odporności. W uzyskanym pokoleniu T₄



Rys. 1. Obecność transgenów w kolejnych pokoleniach roślin transgenicznych.



Rys. 2. Elektroforetyczna analiza produktów PCR – cDNA transgenu LMV CP w roślinach linii MN 944 LMV CP, ścieżki: 1-9 – testowane rośliny, 10 – kontrola negatywna (woda), 11 – kontrola pozytywna (plazmid pKYL MVCP), M – marker wielkości.



Rys. 3. Elektroforetyczna analiza produktów PCR – cDNA transgenu ROKY 2 w roślinach linii AC Gayed ROKY 2, ścieżki: 1-9 – testowane rośliny, 10 – kontrola negatywna (woda), 11 – kontrola pozytywna (plazmid pROKY), M – marker wielkości.

będącym potomstwem odpornych roślin transgenicznych pokolenia T_3 , 83,5% populacji zawierało transgen (rys. 1). Spośród nich 76,6% było odpornych na izolat PVY^{NW}, 82% na PVY^{NTN}Pu, a 54,6% na PVY^{NTN}Gr. Linie transformowane konstrukcją LMV CP były zatem w dużym stopniu zabezpieczone przed brunatną nekrozą nerwów tytoniu. Odwrotną zależność zaobserwowano dla roślin transformowanych konstrukcjami ROKY1 i ROKY2, gdzie późniejsze pokolenia charakteryzowały się niższą odpornością. Znaczny spadek odporności na PVY obserwowano wśród roślin transformowanych konstrukcją ROKY1, gdzie w pokoleniu T_2 zanotowano 60% roślin odpornych na izolat PVY^{NW}, 50% na izolat PVY^{NTN}Pu oraz 38,5% na izolat PVY^{NTN}Gr. Natomiast w pokoleniu T_4 wartości te spadły do 2,7, 5,1%, a nawet 0% w zależności od izolatu wirusa. Najskuteczniejszą ochronę przed użytymi izolatami PVY zapewniły transgeny LMV CP i ROKY2 (tab. 2). Pierwszy z nich okazał się szczególnie skuteczny w roślinach należących do odmiany MN 944 i nieco mniej skuteczny w od-

mianie BY 103. Obecność transgenu ROKY2 w odmianie AC Gayed zapewniła odporność od 53,3 do 77% roślin w zależności od izolatu, jaki zastosowano do inokulacji. Transgen ROKY1 chronił powyżej 30% roślin tylko w przypadku transgeniczných roślin należących do odmiany AC Gayed. W obrębie linii MN 944 ROKY1 wszystkie rośliny były podatne, a w obrębie linii BY 103 ROKY1 zaledwie 8,3% roślin wykazało odporność na jeden z izolatów PVY. Najmniej roślin odporných stwierdzono po inokulacji izolatem Y^{NTN}Gr – najbardziej agresywnym spośród trzech użytych w badaniach. Wyraźnie najwyższy udział roślin odporných zanotowano w obrębie transgeniczných linii otrzymaných przez transformację odmian AC Gayed i MN 944 (tab. 3). Mniej efektywną ochroną przed PVY charakteryzowały się transgeniczne linie odmiany BY 103, a najmniej linie transgeniczne w obrębie odmiany K 326.

Tabela 1

Odporność kolejnych pokoleń roślin transgeniczných na różne izolaty PVY w zależności od rodzaju transgenu

Transgen	Pokolenie	(% roślin odporných na PVY*		
		PVY ^{NW}	PVY ^{NTN} P _U	PVY ^{NTN} Gr
LMV CP	T2	37,3	37	19,5
	T3	50	52,4	43,9
	T4	76,6	82	54,6
	<i>średnio</i>	<i>78,9</i>	<i>57,1</i>	<i>39,3</i>
ROKY1	T2	60	50	38,5
	T3	31,8	17	23,3
	T4	2,7	0	5,1
	<i>średnio</i>	<i>31,5</i>	<i>22,3</i>	<i>22,3</i>
ROKY2	T2	69,1	59,5	51,5
	T3	57,1	31,6	20
	<i>średnio</i>	<i>63,1</i>	<i>47,8</i>	<i>35,6</i>

* – (%) roślin odporných spośród zawierających transgen. Dane stanowią uśrednione wartości z czterech odmian MN 944, K 326, BY 103 i AC Gayed.

Tabela 2

Odporność transgeniczných linii tytoniu na różne izolaty PVY

Linia	(% roślin z transgenem	(% roślin odporných na PVY*		
		PVY ^{NW}	PVY ^{NTN} P _U	PVY ^{NTN} Gr
1	2	3	4	5
MN 944 LMV CP	72,1	84,3	78,5	62,5
K 326 LMV CP	67,1	8,7	14,3	15,6
BY 103 LMV CP	79,4	62,8	67,7	41,4
<i>średnio</i>	<i>72,9</i>	<i>51,9</i>	<i>53,5</i>	<i>39,8</i>

1	2	3	4	5
MN 944 ROKY1	56,2	0	0	0
K 326 ROKY1	94,3	23,1	2,7	8,1
BY 103 ROKY1	93,3	0	8,3	0
AC Gayed ROKY1	86,4	42,4	38,6	31,8
<i>średnio</i>	<i>82,5</i>	<i>16,4</i>	<i>10,3</i>	<i>10</i>
K 326 ROKY2	91,8	42,3	35	31
BY 103 ROKY2	95,5	45,5	23,5	12,1
AC Gayed ROKY2	85,7	77	64,3	53,3
<i>średnio</i>	<i>91</i>	<i>55</i>	<i>41</i>	<i>32,1</i>

* – (%) roślin odpornych spośród zawierających transgen. Dane stanowią uśrednione wartości z trzech pokoleń T₂, T₃ i T₄.

Tabela 3

Odporność transgenicznego tytoniu na różne izolaty PVY w zależności od odmiany

Odmiana	(%) roślin odpornych na PVY		
	PVY ^{NW}	PVY ^{NTNPU}	PVY ^{NTNGr}
MN 944	43,0	40,15	25,8
K 326	28,9	17,1	18,8
BY 103	35,4	32,2	17,0
AC Gayed	72,1	71,1	62,5

Dane stanowią uśrednione wartości z trzech pokoleń T₂, T₃ i T₄ linii transgenicznych uzyskanych w obrębie wymienionych odmian.

4. Dyskusja

W przypadku roślin transformowanych fragmentem cDNA polimerazy PVY obserwowano szybką stabilizację dziedziczenia transgenu, bo w pokoleniu T₄ linii z transgenem ROKY1 wszystkie rośliny okazały się transgeniczne, a w pokoleniu T₃ linii z transgenem ROKY2 – 96,1% osobników zawierało transgen. Mimo że we wcześniejszych pokoleniach obserwowany był w tych liniach także wzrost odporności na PVY^N (1,9), to w kolejnych pokoleniach zauważono tendencję spadkową. Wzrost udziału roślin zawierających transgen nie przekładał się na odporność roślin, która z pokolenia na pokolenie wyraźnie spadała. Rośliny z sensowną wstawką cDNA polimerazy PVY (ROKY1) w 60% były odporne na PVY^{NW} w pokoleniu T₂, a w pokoleniu T₄ zaledwie u 2,7% osobników nie wykryto dużej koncentracji wirusa za pomocą testu ELISA. Podobnie w przypadku roślin z taką samą antysensową wstawką odporność pokolenia T₃ spadła w stosunku do poprzedniego. Biorąc pod uwagę użyte konstrukcje najskuteczniejszą ochronę przed trzema izolatami PVY

stanowiły transgeny ROKY2 i LMV CP. Mniejszą liczbę roślin odpornych zanotowano wśród transformowanych konstrukcją ROKY1. Przyczyną może być wzrost metylacji wstawki w kolejnych pokoleniach. Zjawisko takie obserwowano w przypadku transgenicznego ryżu zawierającego wielokrotne kopie transgeny *bar* niosącego odporność na białafos (10). W pokoleniu R_1 stwierdzono epigenetyczne wyciszenie transgeny. Stan takiej inaktywacji transgeny jest często dziedziczny. Co więcej, jego metylacja może rosnać w kolejnych pokoleniach. Stwierdzono bowiem zmniejszenie liczby niemetylowanych kopii promotora transgeny w pokoleniu R_2 w stosunku do pokolenia R_1 oraz w pokoleniu R_3 w stosunku do pokolenia R_2 . Autorzy sugerują przy tym, że wstawka obcego DNA jest naznaczana do inaktywacji przez system gospodarza, ale wzór metylacji może być przypadkowy lub różny w poszczególnych liniach i tylko transgeny, w których wszystkie główne miejsca są zmetylowane, podlegają inaktywacji. Porównanie odporności pokoleń T_2 i T_3 roślin z transgenem ROKY1 i roślin z transgenem ROKY2 pozwala zauważyć, że więcej osobników podatnych na PVY wystąpiło wśród tych, które transformowano sensową formą fragmentu cDNA wirusowej polimerazy. Uzyskane wyniki potwierdzają zatem twierdzenie, że transgen w orientacji antysensowej jest bardziej efektywny w indukowaniu wyciszenia RNA. Transgeniczne RNA może wiązać się ze swoim komplementarnym odpowiednikiem RNA wirusowego w zainfekowanej roślinie tworząc dwuniciowe struktury podlegające degradacji, zanim wirus uruchomi swój aparat replikacyjny, nie dopuszczając w ten sposób do namnożenia się patogena.

Analiza odporności na wirus Y ziemniaka wcześniejszych pokoleń (T_0 - T_2) transgenicznego tytoniu wykonana została przez Doroszewską (9). W pokoleniach T_1 i T_2 zanotowała ona większą odporność linii z antysensową formą transgeny ROKY w porównaniu z liniami transformowanymi tym samym transgenem w orientacji sensowej. Jedynie w pokoleniu T_0 wstawka sensowa zapewniła wyższy poziom odporności niż jej antysensowy odpowiednik, ale różnica była niewielka.

Spośród dziewiętnastu roślin ziemniaków zawierających sensowy transgen z fragmentem cDNA polimerazy PVY, cztery okazały się odporne na tego wirusa. Natomiast z piętnastu roślin z transgenem sensowym odporne były dwie rośliny. Antysensowy transgen okazał się bardziej efektywny również w tytoniu, gdzie cztery z dziewiętnastu roślin transformowanych tym genem wykazało odporność na PVY, podczas gdy na osiemnastu osobników zawierających sensową wstawkę odpornych było trzech (15).

Na szczególną uwagę zasługuje odmiana AC Gayed transformowana wprowadzicie tylko konstrukcją ROKY, ale cechująca się wysoką odpornością na trzy izolaty wirusa. Wydaje się, że odmiana AC Gayed stanowi najkorzystniejsze środowisko genetyczne dla tego transgeny niezależnie od jego orientacji. Z kolei najkorzystniejszym środowiskiem genetycznym dla genu LMV CP jest odmiana MN 944. Rokuje ona tym bardziej duże nadzieje, że w wyniku krzyżowania linii MN 944 LMV CP z rodzimą odmianą Wiślica, która charakteryzuje się częściową naturalną odpornością na PVY (11), wszystkie otrzymane mieszańce wykazywały całkowitą odporność na trzy uży-

te izolaty. Odmiana Wiślca podatna jest bowiem na dwa wymienione izolaty: Y^{NTN}-Pu i Y^{NTN}Gr. Jest to niezwykle cenne z uwagi na możliwość połączenia dwóch rodzajów odporności, a tym samym rozszerzenia spektrum odporności form mieszańcowych. Ponadto linie MN 944 LMV CP, AC Gayed ROKY1 i AC Gayed ROKY2 charakteryzowały się stosunkowo dobrymi cechami użytkowymi (12). Wcześniejsze pokolenia linii odmiany MN 944 transformowanej konstrukcją LMV CP inokulowane izolatem PVY^N również wykazywały tendencję wzrostu odporności (1). Według prac opublikowanych przez Dinant i in. (4,8), w których wykorzystano tę samą konstrukcję genową do transformacji sałaty i tytoniu, w pokoleniu R₀ połowa z 34 transgenicznych roślin tytoniu była odporna na PVY. Również kolejne pokolenie było całkowicie bądź częściowo (opóźnienie lub osłabienie symptomów choroby) odporne. Wszystkie rośliny transformowane, w których wykryto obecność białka wykazywały odporność na 5 różnych izolatów. Natomiast linie, w których nie dochodziło do syntezy białka, pozostawały podatne na wirusa. Te obserwacje pozwoliły wnioskować, że ochrona antywirusowa roślin jest skorelowana z ekspresją genu LMV CP, która może dać wysoki poziom heterologicznej ochrony przeciw PVY w tytoniu. Homologia składu aminokwasowego białka płaszczka wirusów Y ziemniaka i mozaiki sałaty wynosi bowiem 66% (8).

Mimo że testom odpornościowym poddawano tylko rośliny, w których uprzednio stwierdzono obecność transgeny, to jednak nie we wszystkich osobnikach ujawniła się cecha odporności. Jednym z czynników decydujących o ujawnieniu się cechy warunkowanej przez transgen jest też efekt pozycji, czyli miejsce włączenia wstawki (13). Wektorem użytym do transformacji pokolenia T₀ badanych roślin tytoniu był plazmid Ti *Agrobacterium tumefaciens* (9). Transgeny, jako część T-DNA tej bakterii, często integrują w różnych miejscach chromosomów. Jeśli zostaną włączone w region euchromatyny, w transkrypcyjnie aktywny region, na ich ekspresję mogą wpływać sekwencje regulatorowe sąsiednich genów gospodarza. Jeśli transgeny zintegrują wewnątrz lub w pobliżu powtarzających się sekwencji DNA albo w region heterochromatyny, mogą być inaktywowane (14). Heterochromatyna zazwyczaj nie sprzyja wysokiemu poziomowi ekspresji genów (15). Jest regionem w pobliżu centromerów i telomerów, nie kodującym lub kodującym w bardzo małym stopniu i wyciszonym przez epigenetyczną modyfikację DNA i histonów. Modyfikacje histonów i DNA zależne od RNAi (ang. *interference* RNA) mogą powodować imprinting, czyli takie oznaczenie sekwencji chromosomowych, które jest następnie utrzymywane w trakcie podziału komórkowego. Takie oznaczenie jest stabilne i dziedziczne (16). W wyniku TGS (ang. *Transcriptional Gene Silencing*) promotor i czasem region kodujący wyciszanego transgeny jest silnie zmetylowany, co nie pozwala na przyłączenie się czynników transkrypcyjnych (17).

Kolejnym ważnym czynnikiem związanym z wyciszaniem jest liczba kopii transgeny w tym samym miejscu integracji. Transgeny z T-DNA mogą zintegrować po 2 lub więcej sztuk do jednego miejsca na chromosomie. Takie T-DNA mogą tworzyć bezpośrednie lub odwrócone powtórzenia i mają tendencję do podlegania inakty-

wacji (14). Być może transgeny włączane były do genomu w postaci bezpośrednich lub odwróconych powtórzeń. Tandemowe ułożenie transgeny powoduje jego wyciszenie (15). Również odwrócona kopia transgeny może prowadzić do produkcji dsRNA, które może zostać włączone w szlak RNAi (16,18,19).

W większości publikacji traktujących o roślinach transgeniczných pisze się o otrzymywaniu tych roślin i charakteryzuje się tylko pierwsze pokolenia. Batchvarova i in. (20) otrzymali w pokoleniach R₄-R₇ stabilne linie odporne, homozygotyczne pod względem genu *ttr* warunkującego odporność na *Pseudomonas syringae*. Wskazuje to na duże szanse stabilizacji odporności w naszych liniach i potrzebę ich systematycznej selekcji.

W badaniach linii transgeniczných tytoniu z użyciem kilku odmian i konstrukcji genowych wykazano, że transgeneza tytoniu sekwencjami pochodzącymi od patogena daje możliwość uzyskania odmian tytoniu odpornych na PVY z jednoczesnym zachowaniem pożądanych cech jakościowych. Obserwowana w niektórych przypadkach niestabilność ekspresji transgenów wskazuje na potrzebę kontynuacji prac związanych z testowaniem dalszych pokoleń.

5. Podsumowanie

1. Największą skuteczność w ochronie antywirusowej stwierdzono dla transgeny LMV CP, mniejszą w przypadku ROKY2, a najmniejszą dla ROKY1. Procentowy udział roślin zawierających transgen wzrastał z pokolenia na pokolenie, co świadczy o stabilnym dziedziczeniu transgenów.

2. Wśród roślin z transgenem LMV CP obserwowano w kolejnych pokoleniach procentowy wzrost liczby roślin odpornych na poszczególne izolaty PVY, co oznacza stabilizację cechy odporności i wskazuje na możliwość uzyskania wysokiego poziomu heterologicznej ochrony przeciw PVY w tytoniu.

3. W przypadku roślin transformowanych fragmentem cDNA polimerazy PVY obserwowano szybką stabilizację dziedziczenia transgeny. Jednak wzrost udziału roślin zawierających transgen nie przekładał się na odporność roślin, która z pokolenia na pokolenie wyraźnie spadała. Przyczyną mógł być wzrost metylacji wstawki w kolejnych pokoleniach. Więcej osobników podatnych na PVY wystąpiło wśród roślin transformowanych transgenem ROKY1 niż ROKY2, co świadczy o wyższej efektywności transgeny w orientacji antysensowej.

4. Spośród czterech badanych, odmiana MN 944 okazała się najlepszym środowiskiem genetycznym dla transgeny LMV CP, a odmiana AC Gayed dla transgeny ROKY.

Literatura

1. Doroszevska T., Chachulska A. M., (2000), *Biotechnologia*, 4(51), 128-141.
2. Doroszevska T., Berbeć A., (1996), *J. Genet. Breed.*, 50, 75-82.
3. Doroszevska T., (2007), *Biuletyn IHAR*, 244, 273-287.
4. Dinant S., Maisonneuve B., Albouy J., Chupeau Y., Chupeau M. Ch., Bellec Y., Gaudefroy F., Kusiak Ch., Souche S., Robaglia Ch., Lot H., (1997), *Mol. Breed.*, 3, 75-86.
5. Chachulska A. M., Chrzanowska M., Flis B., Krzymowska M., Lipska-Dwuźnik A., Robaglia Ch., Zagórski W., (1997), *Biotechnologia*, 4(39), 48-54.
6. Linsmayer E. M., Skoog F., (1965), *Physiol. Plantarum*, 18, 100-127.
7. Czubacka A., Doroszevska T., (2004), *Biotechnologia*, 2(65), 37-45.
8. Dinant S., Blaise F., Kusiak Ch., Astier-Manificier S., Albouy J., (1993), *Phytopathology*, 83, 818-824.
9. Doroszevska T., (2004), *Monografie i rozprawy naukowe*, 6, IUNG, Puławy.
10. Kumpatla S. P., Hall T. C., (1998), *Plant J.*, 14(1), 129-135.
11. Doroszevska T., (2004), *Monografie i rozprawy naukowe*, 6, IUNG, Puławy.
12. Czubacka A., Doroszevska T., (2010), *Euphytica*, 172, 35-47.
13. Brumin M., Stukalov S., Haviv S., Muruganatham M., Moskovitz Y., Batuman O., Fenigstein A., Ma-wassi M., (2009), *Transgenic Res.*, 18, 331-345.
14. Stam M., Mol J. N., Kooter J. M., (1997), *Ann. Bot.*, 79, 3-12.
15. Matzke M. A., Birchler J. A., (2005), *Nature*, 6, 24-35.
16. Lippman Z., Martienssen R., (2004), *Nature*, 431, 364-370.
17. Waterhouse P. M., Wang M., Lough T., (2001), *Nature*, 411, 834-842.
18. Mello C. C., Conte D., (2004), *Nature*, 431, 338-342.
19. Brodersen P., Voinnet O., (2006), *Trends Genet.*, 22(5), 268-280.
20. Batchvarova R., Nikolaeva V., Slavov S., Bossolova S., Valkov V., Atanassova S., Guelemerov S., Atanassov A., Anzai H., (1998), *Theor. Appl. Genet.*, 97, 986-989.