

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
Państwowy Instytut Badawczy

MARCIN PRZYBYŚ

**Charakterystyka i występowanie wirusa Y ziemniaka (PVY)
w głównych rejonach uprawy tytoniu w Polsce**

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Hodowli i Biotechnologii Roślin
pod kierunkiem
prof. dr hab. Teresy Doroszewskiej

Puławy 2011

Składam serdeczne podziękowania:

*Pani prof. dr hab. Teresie Doroszewskiej
za bezcenną pomoc i wszystkie uwagi
dotyczące przygotowania tej pracy*

*Pracownikom Zakładu Hodowli i Biotechnologii Roślin
za okazaną pomoc i życzliwość*

Pracę tą dedykuję mojej żonie Hani, synkowi Jasiowi i córeczce Antosi

Spis treści

1. Wstęp i cel badań.....	7
2. Przegląd literatury.....	9
2.1. Organizacja genomu wirusa Y ziemniaka (PVY).....	10
2.2. Występowanie i klasyfikacja biologiczna.....	16
2.3. Mechanizmy ewolucji wirusowego RNA.....	31
2.4. Źródła odporności tytoniu na PVY i zdolność ich przełamania przez nowe izolaty....	32
3. Materiały i metody.....	36
3.1. Materiał roślinny.....	36
3.2. Doświadczenia polowe.....	37
3.3. Izolaty wirusa.....	38
3.4. Badania biologiczne.....	39
3.4.1. Inokulacja.....	39
3.4.2. Obserwacje objawów chorobowych.....	39
3.5. Badania serologiczne.....	39
3.6. Charakterystyka molekularna izolatów PVY.....	40
3.6.1. Izolacja RNA.....	40
3.6.2. Odwrotna transkrypcja (RT-PCR).....	41
3.6.3. Amplifikacja DNA (PCR).....	41
3.6.4. Elektroforeza produktów reakcji PCR i elucja DNA wirusa.....	42
3.6.5. Trawienie produktów amplifikacji DNA enzymami restrykcyjnymi (RFLP).....	42
3.6.6. Elektroforeza produktów trawienia DNA.....	43
3.7. Analiza filogenetyczna.....	43
3.7.1. Analiza wzorów RFLP.....	43
3.7.2. Sekwencjonowanie genomu wirusa.....	44
3.7.3. Detekcja zdarzeń rekombinacyjnych.....	45
4. Wyniki.....	47
4.1. Występowanie wirusa Y ziemniaka (PVY).....	47
4.1.1. Tempo pojawiania się objawów wywoływanych przez PVY.....	48
4.1.2. Infekcja odmian podatnych w różnych rejonach kraju.....	51
4.1.3. Reakcja odmian odpornych na PVY.....	55
4.1.4. Wpływ temperatury powietrza na porażenie tytoniu przez PVY.....	58
4.2. Charakterystyka serologiczna izolatów PVY.....	60
4.4. Analiza molekularna.....	66
4.4.1. Otrzymywanie i amplifikacja cDNA wirusa.....	66
4.4.2. Trawienie DNA i uzyskiwanie wzorów restrykcyjnych.....	66
4.4.3. Zmienność genomu izolatów PVY.....	66
4.4.4. Trawienie enzymem Hin6 I.....	69
4.4.5. Trawienie enzymem Hinf I.....	71
4.4.6. Trawienie enzymem Sdu I.....	73
4.4.7. Uzyskanie i analiza pełnej sekwencji nukleotydowej wybranych izolatów PVY..	75
4.4.7.1. Zmienność sekwencji aminokwasowej białka VPg.....	76
4.4.7.2. Zmienność sekwencji aminokwasowej białka P1.....	77
4.4.7.3. Zmienność sekwencji aminokwasowej białka HC-Pro.....	78
4.4.7.4. Zmienność sekwencji aminokwasowej białka P3.....	80
4.4.7.5. Zmienność sekwencji aminokwasowej białka 6K1.....	82
4.4.7.6. Zmienność sekwencji aminokwasowej białka CI.....	83
4.4.7.7. Zmienność sekwencji aminokwasowej białka 6K2.....	85
4.4.7.8. Zmienność sekwencji aminokwasowej białka NIa-Pro.....	86

4.4.7.9. Zmienność sekwencji aminokwasowej białka NIb	87
4.4.7.10. Zmienność sekwencji aminokwasowej białka CP	90
4.4.8. Położenie filogenetyczne zsekwencjonowanych izolatów PVY na tle pełnych sekwencji genomowych PVY umieszczonych w GenBanku.....	91
4.4.9. Zdarzenia rekombinacyjne w genomie PVY	98
5. Dyskusja	102
5.1. Występowanie wirusa Y ziemniaka w Polsce i na świecie	102
5.2. Serologiczne różnicowanie izolatów wirusa Y ziemniaka.....	105
5.3. Molekularne różnicowanie badanych izolatów wirusa (RFLP)	107
5.4. Zdolność izolatów wirusa do przełamania odporności tytoniu	110
5.5. Różnicowanie sekwencji i klasyfikacja filogenetyczna	113
5.6. Rekombinacje.....	118
6. Podsumowanie i wnioski	122
7. Literatura	124
8. Załączniki	151

Wykaz skrótów

BYMV	wirus mozaiki żółtej fasoli; Bean Yellow Mosaic Virus
cDNA	komplementarny DNA; complementary DNA
CI	białko tworzące ciała inkluzyjne w cytoplazmie; cylindrical inclusion protein
CP	białko płaszczka; coat protein
DAS-ELISA	test immunoenzymatyczny; Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immunosorbent Assay
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe; deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoksytryójfosfonukleotydy; deoxyribonucleotide triphosphate
dsRNA	dwuniciowy RNA; double stranded RNA
DTT	ditiotreitol; dithiotreitol
EDTA	kwasy etylenodiaminotetraoctowe; ethylenediamine tetraacetic acid
eIF4E	eukariotyczny czynnik inicjacji translacji; Eukaryotic translation initiation factor 4E
kb	tysiąc par zasad; kilobase
LMV	wirus mozaiki sałaty; Lettuce Mosaic Virus
mRNA	informacyjny RNA; messenger RNA
NIa	białko NIa tworzące inkluzje jądrowe; nuclear inclusion a protein
NIb	białko NIb tworzące inkluzje jądrowe; nuclear inclusion b protein
NJ	metoda przyłączania sąsiadów; Neighbor-Joining
nt	nukleotydy; nucleotides
NTR	region niepodlegający translacji; Non-Translated Region
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy; Polymerase Chain Reaction
PDR	odporność pochodząca od patogena; Pathogen-Derived Resistance
PSbMV	wirus mozaiki i liściozwoju grochu; Pea Seed-borne Mosaic Virus
PTNRD	pierścieniowa nekrotyczna choroba bulw ziemniaka; Potato Tuber Necrotic Ringspot Disease
PVY	wirus Y ziemniaka; Potato Virus Y
PVY ^C	szczep C wirusa Y ziemniaka; PVY C strain
PVY ^N	szczep nekrotyczny (N) wirusa Y ziemniaka; PVY necrotic strain
PVY ^{NTN}	grupa izolatów nekrotycznych wirusa Y ziemniaka wywołujących nekrozy na bulwach; PVY necrotic tuber necrosis
PVY ^{NW}	grupa izolatów nekrotycznych wirusa Y ziemniaka niewykrywanych

	przez przeciwciała monoklonalne anti-PVY ^N ; group of PVY necrotic isolates non detectable by MAbs anti-PVY ^N
PVY ^O	szczep zwykły (O) wirusa Y ziemniaka; PVY ordinary strain
PVX	wirus X ziemniaka; Potato Virus X
RDP	program do wykrywania rekombinacji; Recombination Detection Program
RFLP	polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych; Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	kwasy rybonukleinowe; ribonucleic acid
rpm	liczba obrotów na minutę; rotation per minute
RT-PCR	reakcja odwrotnej transkrypcji; reverse transcription
ssRNA	jednoniciowy RNA; single stranded RNA
TEV	wirus cętkowatej plamistości tytoniu; Tobacco Etch Virus
TMV	wirus mozaiki tytoniu; Tobacco Mosaic Virus
TSWV	wirus brązowej plamistości pomidora; Tomato Spotted Wilt Virus
TVMV	wirus cętkowatości nerwów tytoniu; Tobacco Vein Mottling Virus
UPGMA	metoda nieważonych średnich połączeń; Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
VAM	odmiana tytoniu Virgin A Mutant; Virgin A Mutant cultivar
VPg	białko połączone z 5' końcem genomu wirusa; viral genome-linked protein
YMV	wirus mozaiki jama; Yam Mosaic Virus

Wykaz jednoliterowych kodów aminokwasów

A	Alanina	M	metionina
C	Cysteina	N	asparagina
D	kwas asparaginowy	P	prolina
E	kwas glutaminowy	Q	glutamina
F	Fenyloalanina	R	arginina
G	Glicyna	S	Seryna
H	Histydyna	T	treonina
I	Izoleucyna	V	Walina
K	Lizyna	W	tryptofan
L	Leucyna	Y	tyrozyna

1. Wstęp i cel badań

Wirus Y ziemniaka *Potato virus Y* (PVY) należy do rodzaju *Potyvirus*, rodziny *Potyviridae* – największej i ekonomicznie najważniejszej grupy wirusów roślinnych, do której zaliczanych jest 128 zatwierdzonych oraz 89 wstępnie zaliczonych gatunków (Fauquet i in., 2005). PVY infekuje najważniejsze rolniczo gatunki z rodziny *Solanaceae* – ziemniaki, tytoń, pomidory i paprykę (De Bokx i Huttinga, 1981). Nekrotyczne szczepy PVY wywołują brunatną nekrozę nerwów liści tytoniu, co utrudnia transport wody i soli mineralnych oraz ogranicza zdolność asymilacji i wymiany gazowej (Wen i in., 1999). Powoduje to obniżenie plonu, spadek jakości surowca oraz niekorzystnie wpływa na zwiększenie zawartości azotanów w liściach tytoniu (Verrier i in., 2001). W środowisku naturalnym przenoszony jest w sposób nietrwały – na kłujce wielu gatunków mszyc, w trakcie żerowania na roślinie (Sigvald, 1984). Taki sposób transmisji wirusa sprawia, że chemiczne zwalczanie jest dalece nieskuteczne w zapobieganiu choroby.

Prowadzone od wielu lat międzynarodowe badania wykazały obecność tego patogena w większości krajów świata (Chrzanowska, 1994; Doroszevska, 2004; McDonald i Kristjansson, 1993; Ohshima K i in., 2000). Jednakże większość badań dotyczy izolatów PVY pochodzących z ziemniaka, mniej natomiast jest danych o izolatach tytoniowych. Wyniki badań prowadzonych w Polsce potwierdziły, że większość izolatów PVY infekuje zarówno rośliny tytoniu jak i ziemniaka (Chrzanowska i Doroszevska, 1997). Stanowi to olbrzymi problem, ponieważ plantacje ziemniaka są głównym źródłem infekcji upraw tytoniu. Straty w plonach liści tytoniu u odmian podatnych są bardzo duże, co wynika ze złej jakości surowca pochodzącego z zainfekowanych roślin i tym samym dyskwalifikuje jego przydatność. Z tego powodu w Polsce możliwa jest uprawa wyłącznie odmian odpornych.

Źródłem odporności najczęściej wykorzystywanym w hodowli twórczej wielu odmian tytoniu jest gen *va* pochodzący od odmiany Virgin A Mutant (Koelle, 1961). Trudne do jednoznacznego określenia jest źródło odporności polskich odmian z uwagi na słabo udokumentowane ich pochodzenie w przeszłości. Innym źródłem genów odporności na PVY są dzikie gatunki rodzaju *Nicotiana* (Doroszevska i Depta, 2011). Wiele z nich wykorzystywano w hodowli odpornościowej (Doroszevska, 2010; Lewis, 2007; Berbeć i Głazewska, 1988; Berbeć, 1988). Często jednak przeniesienie pełnej odporności z dzikiego gatunku następuje wiele trudności związanych z krzyżowaniem oddalonym i utrzymaniem wysokiej jakości surowca. Wykorzystanie metody transformacji genetycznej do uzyskania odporności na PVY nie prowadzi do tak dużych zmian w konfiguracji genotypu jak ma to

miejsce podczas krzyżowania międzygatunkowego (Doroszevska, 2004; Czubačka i Doroszevska, 2010), co wydatnie skraca proces hodowli, jednakże odmiany uzyskane tą metodą wymagają akceptacji.

Istniejące i wykorzystywane obecnie źródła odporności były stosunkowo efektywne wobec powszechnie występujących szczepów PVY. Jednakże w ostatnich latach w Polsce, jak też w wielu krajach świata obserwuje się porażanie tych odmian. Na rozwój nasilenia choroby mają wpływ korzystne dla patogena warunki klimatyczne oraz pojawiające się nowe izolaty wirusa, zdolne do przełamania dostępnych źródeł odporności (Doroszevska, 2008). Rozpoznanie i szczegółowa charakterystyka tych izolatów, a zwłaszcza określenie mechanizmu odpowiedzialnego za nabytą zdolność do infekcji, jest bardzo ważnym zagadnieniem poznawczym, ale też przydatnym w praktyce. Przeciwdziałanie chorobie powodowanej przez PVY odbywa się poprzez hodowlę odpornościową, która może być skuteczna jedynie dla zdefiniowanych szczepów i izolatów tego wirusa.

Głównym celem badań była ocena występowania PVY w głównych rejonach uprawy tytoniu Polsce oraz wszechstronna charakterystyka zgromadzonych izolatów wirusa.

Wyodrębniono też cele szczegółowe:

- ocenę stanu porażenia odmian o zróżnicowanym charakterze i stopniu odporności w różnych rejonach kraju,
- charakterystykę biologiczną obejmującą obserwacje charakteru wywoływanych objawów, stopnia porażenia roślin, określenie zdolności do przełamania odporności odmian tytoniu przez izolaty wirusa,
- diagnostykę serologiczną z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych w celu określenia przynależności poszczególnych izolatów do odpowiednich serotypów, pozwalającą na porównanie izolatów zebranych z tytoniu z izolatami pochodzącymi z ziemniaka.
- analizę molekularną obejmującą określenie zróżnicowania genetycznego zgromadzonych izolatów na podstawie pełnych sekwencji genomowych wirusa oraz wzorów restrykcyjnych uzyskanych metodą PCR-RFLP, analizę filogenetyczną oraz określenie podłoża molekularnego odpowiedzialnego za zdolność do przełamania odporności.

2. Przegląd literatury

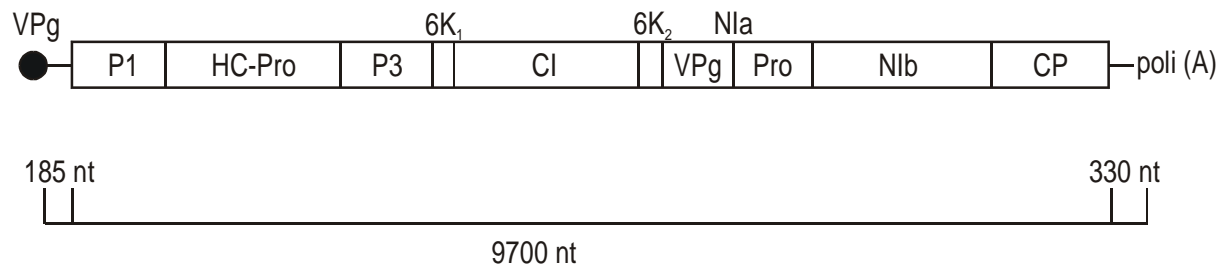
Wirus Y ziemniaka (PVY) infekuje gatunki z rodziny *Solanaceae*, zarówno uprawne – ziemniaki, pomidory, tytoń i paprykę (Nie i in., 2003) jak i niektóre dzikie gatunki z rodzaju *Solanum* (Morel i in., 2000) i z rodzaju *Nicotiana* (Doroszevska i Depta, 2011; Cardin i Moury, 2008). Ponadto na Wyspach Kanaryjskich stwierdzono zainfekowaną przez PVY lawendę (*Lavandula canariensis*), mleczyk zwyczajny (*Sonchus oleraceus*), ślacz (*Malva parviflora*), koper włoski (*Foeniculum vulgare*), powój (*Convolvulus althaeoides*) i nagietek polny (*Calendula arvensis*) (Espino de Paz i in., 1997). Gospodarzami dla PVY mogą być także: iglica pospolita (*Erodium cicutarium*), bodziszek drobny (*Geranium pusillum*), sałata komasowa (*Lactuca serriola*), jasnota purpurowa (*Lamium purpureum*) (Kaliciak i Syller, 2009). Jak wskazują autorzy (Kaliciak i Syller, 2009) infekcja tych gatunków ma charakter bezobjawowy.

W środowisku naturalnym PVY przenoszony jest przez ponad 50 gatunków mszyc (Kanavaki i in., 2006). Sposób przenoszenia wirusa określany jest jako nietrwały (na kłujące owada), co sprawia, że infekcja następuje szybko, zanim zacznie działać środek owadobójczy (De Bokx i Huttinga, 1981; DiFonzo, 1995), dlatego też zwalczanie mszyc nie ogranicza w sposób dostateczny rozwoju choroby (Doroszevska, 2008). Czas potrzebny na pobranie i przeniesienie patogena jest bardzo krótki i trwa od kilku sekund do kilku minut, natomiast sama mszyca jest w stanie zakażać kolejne rośliny jeszcze przez okres kilku godzin (Ferreles i Collar, 2001; Pirone i Perry, 2002). Chociaż samo pozyskanie wirusa przez mszyce może trwać bardzo krótko, bo już 5 sekund, to dłuższe żerowanie od 10 sekund do minuty na zainfekowanej roślinie, znacznie zwiększa efektywność transmisji patogena (Kanavaki i in., 2006). Natomiast bardzo długie żerowanie na zainfekowanej roślinie – od 5 do 10 minut nie powoduje dalszej transmisji wirusa, bądź znacznie ją ogranicza (Bradley, 1954; Singh i in., 1984). Różne gatunki mszyc wykazują różną wydajność w transmisji wirusa (Ferreles i in., 1993; Harrington i in., 1986; Katis i Gibson, 1985; Perez i in., 1995; Sigvald, 1984; van Hoof, 1980), ale uznaje się, że najbardziej wydajnym gatunkiem jest *Myzus persicae* (Kanavaki i in., 2006). Wprowadzenie barier w postaci innych upraw (słonecznika, kukurydzy, wyki, sorgo) może znacząco wpływać na zmniejszenie nasilenia infekcji wirusem plantacji tytoniu, papryki, czy ziemniaków, aczkolwiek stopień infekcji zależy też od warunków pogodowych (Ferreles, 2000). PVY w warunkach sztucznych może być także przenoszony mechanicznie z sokiem zakażonej rośliny. Opryskiwanie ekstraktem z korzeni dziwaczka peruwiańskiego (*Mirabilis jalapa*) zawierającym białko inaktywujące rybosomy

(ang. ribosome inactivating protein – RIP) niemalże w 100% zabezpieczało tytoń przed PVY (Vivanco i in., 1999). Niestety zabezpieczenie to było skuteczne tylko w przypadku mechanicznego przenoszenia wirusa, natomiast kiedy patogen przenoszony był przez mszyce, takie zabiegi nie zabezpieczały roślin (Vivanco i in., 1999). Do ograniczenia rozwoju patogena w zainfekowanym tytoniu Nie (2006) zastosował kwas salicylowy. Opryskiwał nim sadzonki tytoniu, co w efekcie prowadziło do opóźnienia powstawania nekroz łądyg o 1-2 dni. Późniejsze analizy wykazały, że akumulacja PVY w tkankach tytoniu była upośledzana we wczesnych stadiach infekcji wirusem, co było powodowane jego obniżoną replikacją (Nie, 2006). We wczesnych stadiach po zainfekowaniu rośliny przez PVY, skład hormonów w roślinie ulega zmianie. Już po 1 dniu zwiększa się kilkukrotnie stężenie kwasu jasmonowego (JA) i jego prekursora kwasu 12-oksyfytodienowego (OPDA), nie odnotowano natomiast istotnych różnic w stężeniach kwasu salicylowego (SA), kwasu idoliolooctowego (IAA) i kwasu abscysynowego (ABA) (Kovač, 2009).

2.1. Organizacja genomu wirusa Y ziemniaka (PVY)

Wirus Y ziemniaka (PVY) ma budowę nitkowatą o długości 680-900nm i średnicy 12-15nm. Wirion ma postać helikalnie skręconej otoczki białkowej, składającej się z ok. 2000 kopii białka płaszczka (28-34kDa) stanowiącego 95% masy całego wirionu (Ward i in. 1994). Wewnątrz znajduje się genom (rys.1), złożony z pojedynczej sensownej nici RNA o długości ok. 9700 rybonukleotydów (Powell i in. 1986), kodujący poliproteinę zbudowaną z 3063 aminokwasów (Robaglia i in., 1989). Z końcem 5' kowalencyjnie związane jest białko VPg, zaś koniec 3' jest poliadenylowany (Robaglia i in., 1989). Genom wirusa zawiera jedną, otwartą ramkę odczytu, która koduje poliproteinę oraz dwa regiony nie kodujące: 5'NTR i 3'NTR (Shukla i in., 1994). Wirus w pierwszej kolejności po wnikięciu do komórki gospodarza wytwarza poliproteinę, która jest następnie trawiona przez trzy proteazy wirusa, co w efekcie prowadzi do powstania aktywnych białek wirusowych (Carrington i Dougherty, 1987; Carrington i in., 1989; Carrington i Freed, 1990; Verchot i in., 1991). W kolejności od N-końca poliproteiny są to: proteaza P1, białko HC-Pro, białko P3, białko 6K₁, białko CI, białko 6K₂, małe białko inkluzji jądrowych NIa, później przekształcane w białko VPg i proteazę Pro, duże białko inkluzji jądrowych NIb oraz białko płaszczka CP (Shukla i in., 1991; Riechmann i in., 1992; Ward i in., 1994).



Rys.1. Mapa genomu wirusa Y ziemniaka (PVY) (Glais i in., 1998)

Funkcje poszczególnych białek przedstawiają się następująco:

Białko P1, to proteaza serynowa, która katalizuje odłączenie się jej samej od poliproteiny w miejscu Tyr-Ser na łączeniu z białkiem HC-Pro (Verchot i Carrington, 1995). C-końcowa część białka zawiera w pełni funkcjonalną proteazę z triadą katalityczną charakterystyczną dla tego typu proteaz (His-214, Asp-223, Ser-256), podczas gdy N-koniec nie jest niezbędny do aktywności proteolitycznej białka P1 (Verchot i in., 1992) i cechuje go wysoka zmienność (Verchot i Carrington, 1995). Białko P1 w warunkach *in vitro* posiada zdolność do przyłączania się zarówno do jednoniciowego RNA (Brantley i Hunt, 1993), jak również do dwuniciowego RNA oraz jednoniciowego DNA, ale już nie wykazuje zdolności do przyłączania do dwuniciowego DNA (Soumounou i Laliberte, 1994). Białko P1 jest również czynnikiem stymulującym replikację genomu wirusa (Verchot i Carrington, 1995) oraz bierze udział w przemieszczaniu się wirusa z komórki do komórki (Atabekov i Taliansky, 1990; Brantley i Hunt, 1993, Dougherty i Semler, 1993). W cytoplazmie tworzy agregaty z białkiem CI (Arbatova i in., 1998).

HC-Pro (*ang. helper component-protease*), to wielofunkcyjne białko (Maia i in., 1996) akumulowane w zainfekowanych komórkach jako bezpostaciowe inkluzje (Baunoch i in., 1990). C-końcowa część białka wykazuje aktywność proteazy cysteinowej (Oh i Carrington, 1989), przez co autokatalizuje odłączenie się od poliproteiny (Carrington, 1989; Carrington i Herndon, 1992). Mutacje w domenie odpowiedzialnej za aktywność proteolityczną powodują zahamowanie replikacji wirusa w protoplastach i roślinach (Klein i in., 1994; Kasschau i Carrington 1995). Drugą funkcją tego białka jest udział w przyłączaniu wirionów do kłujki na aparacie gębowym mszyc podczas ich żerowania na zainfekowanych roślinach, stanowi więc swoisty czynnik wspomagający rozprzestrzenianie się wirusa (*ang. aphids transmission helper*) (Atreya i in., 1992; Wang i in., 1996; Blanc i in., 1997), pewien rodzaj mostu pomiędzy białkiem płaszczka wirusa (CP), a domniemanym receptorem na aparacie gębowym

mszyc (Pirone i Blanc, 1996). Aktywna domena czynnika wspomagającego (*ang.* *HC = helper component*) znajduje się w N-końcowej i centralnej części białka HC-Pro (Atreya i in., 1992; Atreya i Pirone, 1993). Pojedyncza mutacja w genomie wirusa – tranzycja z A na G w pozycji 1184 powoduje zmianę w sekwencji aminokwasowej białka HC-Pro w pozycji 334 z Lys na Glu, co w efekcie prowadzi do obniżenia transmisji wirusa przez mszyce (Legavre i in., 1996). W Hiszpanii przeprowadzono badania nad mutacjami w genie kodującym HC-Pro izolatów pochodzących z papryki, gdzie stwierdzono dwie inne mutacje upośledzające funkcje czynnika wspomagającego rozprzestrzenianie się wirusa (HC). Pierwsza z nich, to tranzycja z G na A w pozycji 266, powodująca zmianę w sekwencji aminokwasowej białka HC-Pro w pozycji 89 z Arg na Gln i druga mutacja z G na A w pozycji 456, zmieniająca sekwencję aminokwasową białka w pozycji 152 z Met na Ile (Llave i in., 1999).

Białko HC-Pro jest również niezbędne w procesie replikacji genomu oraz w ujawnianiu się objawów chorobowych (Atreya i Pirone, 1993; Maia i in., 1996; Atreya i in., 1992). Białko HC-Pro wykazuje zdolność do niespecyficznego przyłączania się swym bogatym w cysteinę N-końcem do jednoniciowego RNA, co może sugerować, że białko to może oddziaływać z genomowym RNA wirusa podczas replikacji (Maia i Bernardi, 1996). Białko HC-Pro bierze również udział w przemieszczaniu się wirusa z komórki do komórki (Rojas i in., 1997) oraz w przechodzeniu wirusa do naczyń i rozprzestrzenianiu się infekcji (Cronin i in., 1995; Saenz i in., 2002). Odpowiada także za synergię w działaniu podczas koinfekcji innym wirusem (Pruss i in., 1997).

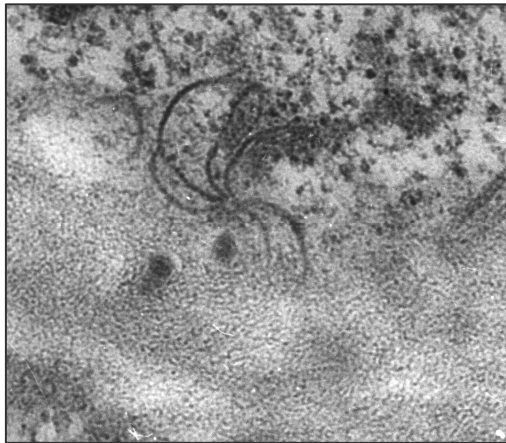
HC-Pro wchodzi także w interakcję z różnymi białkami gospodarza (Guo i in., 2003), również białkami typu kalmoduliny wymaganej w procesie wyciszania genów (Anandalakshmi i in., 2000), przeciwdziałając tym samym supresji wyciszania genów (Llave i in., 2000).

W zainfekowanych przez PVY roślinach, białko HC-Pro zostało wykryte w chloroplastach (Gunasinghe i Berger, 1991), w których odbywa się proces fotosyntezy i wiele innych fundamentalnych przemian metabolicznych (Maple i Møller, 2007). Białko HC-Pro oddziaływuje z natywnym białkiem występującym w chloroplastach – MinD, co w efekcie prowadzi do spadku liczebności chloroplastów i zmiany ich rozmiarów w zainfekowanej przez PVY komórce (Jin Y i in., 2007; Pompe-Novak i in., 2001, Coletti i in., 2000, Dinkins i in., 2001).

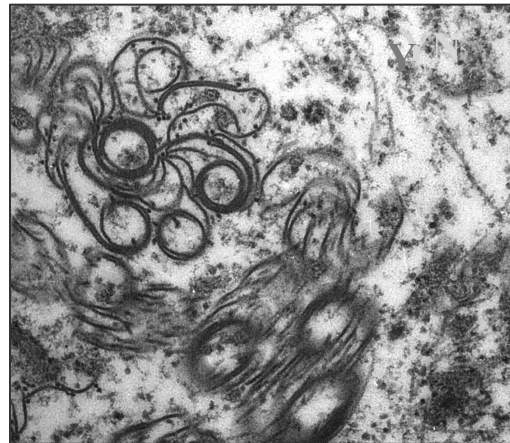
Białko P3 jest słabo poznane, ale zawiera najprawdopodobniej domenę transmembranową i może brać udział w zakotwiczeniu kompleksu replikacyjnego (Rodriguez-Cerezo i Shaw,

1991; Klein i in., 1994; Martin i in. 1995), który tworzony jest przez białka CI, VPg, NIa, NIb związane z RNA (Merits i in., 1998; Merits i in., 1999).

Białko CI (*ang. cylindrical inclusion*) ulega nagromadzeniu w cytoplazmie zainfekowanych komórek w formie ciał inkluzyjnych o wielkości od 200 do 1000 nm (Edwardson i in., 1984). W efekcie powoduje dezorganizację komórek parenchymatycznych, zniekształcenie komórek epidermalnych, indukuje nieprawidłowości w budowie chloroplastów i mitochondriów, a także inicjuje tworzenie zwojów na błonie komórkowej i tworzenie nietypowych ciał lipidowych (Shand i in., 2009). W komórkach parenchymatycznych tytoniu w zależności od przynależności izolatu wirusa (PVY^{NW} lub PVY^{NTN}) tworzą się odpowiednio ciała inkluzyjne o strukturze „pinwell” (rys. 2) lub „scrolls” (rys. 3)



Rys. 2. Ciała inkluzyjne w komórkach parenchymatycznych tytoniu po zakażeniu wirusem Y ziemniaka z grupy PVY^{NW} (Doroszewska i in., 1999)



Rys. 3. Ciała inkluzyjne w komórkach parenchymatycznych tytoniu po zakażeniu wirusem Y ziemniaka z grupy PVY^{NTN} (Doroszewska i in., 1999)

Białko CI jest helikazą RNA (Lain i in., 1990; Lain i in., 1991). Za aktywność helikazy RNA odpowiada C-koniec białka (Robaglia i in. 1989; Riechmann i in., 1992).

Białko NIa (*ang. nuclear inclusion a*), zbudowane jest z dwóch domen: VPg na N-końcu, która jest autokatalitycznie oddzielana od reszty białka NIa (Dougherty i Parks, 1991; Shahabuddin i in., 1998; Murphy i in., 1990) oraz domeny proteolitycznej (NIa-proteazy) na C-końcu, która wykazuje aktywność proteazy cysteinowej (Rawlings i Barrett, 1994; Rawlings i Barrett, 1996). Centrum aktywne NIa-proteazy zbudowane z His, Asp i Cys zlokalizowane jest na jej C-końcu (Dougherty i in., 1989; Garcia i in., 1989). Domena zlokalizowana na N-końcu NIa-proteazy, bierze udział w procesie replikacji (Rawlings i

Barrett, 1994). NIa-proteaza wspólnie z białkiem NIb tworzy agregaty w formie inkluzji jądrowych (Carrington i Dougherty, 1988), chociaż może też występować w cytoplazmie (Rouis i in., 2001).

Białko VPg łączy się z końcem 5' genomu wirusa chroniąc go tym samym przed trawieniem przez egzonukleazy oraz służy za starter w procesie replikacji (Siaw i in. 1985). Ostatni aminokwas białka VPg stanowi tyrozyna, która wiązaniem fosfodiesterowym połączona jest z genomowym RNA wirusa. Jakakolwiek zmiana tego aminokwasu na inny, skutkuje zahamowaniem replikacji i uniemożliwia zakażenie roślin (Murphy i in., 1991; Murphy i in., 1996, Schaad i in., 1996).

Białko 6K1 jest jednym z dwóch najmniejszych peptydów o masie 6kDa (Hong X.Y. i in., 2007). Funkcje tego białka nie są dokładnie znane, ale przypuszcza się, że może pełnić krytyczną rolę w replikacji wirusa lub rozprzestrzenianiu się infekcji z komórki do komórki (Johansen i in., 2001).

Białko 6K2 bierze udział w rozprzestrzenianiu się infekcji poprzez naczynia oraz w wywoływaniu objawów chorobowych na zainfekowanych roślinach (Spetz i Valkonen, 2004; Tomimura i in., 2004). Ponadto jest nieodzowne w procesie replikacji genomu wirusa (Spetz i Valkonen, 2004). Pełni ono rolę kotwicy przytwierdzającej kompleks replikacyjny do retikulum endoplazmatycznego (Merits i in. 2002; Restrepo-Hartwig i Carrington, 1994; Li i in., 1997; Schaad i in., 1997).

Białko NIb (*ang. nuclear inclusion b*), jest polimerazą RNA, zależną od RNA (Robaglia i in., 1989; Koonin, 1991). Białko NIb wspólnie z NIa-proteazą tworzą agregaty w formie inkluzji jądrowych (Carrington i Dougherty, 1988). Ponadto NIb posiada zdolność do translokacji jądrowych (Li i in., 1997). Polimeraza NIb poprzez oddziaływanie z białkiem NIa, bierze udział w inicjacji powstawania kompleksu replikacyjnego (Hong i in., 1995; Li i in., 1997).

Białko płaszcz (*ang. coat protein = CP*), spełnia wiele funkcji. Jego główną rolą jest opłaszczenie genomowego RNA wirusowego. Jedynie centralna część białka jest niezbędna do utworzenia z wielu cząstek białka – płaszczu wirusa oraz bierze udział w infekowaniu rośliny w czasie sztucznej inokulacji (Shukla i in., 1988; Shukla i in., 1991; Dolja i in., 1994;

Dolja i in., 1995). Białko płaszczka pełni również ważną rolę w przenoszeniu wirusa przez wektory. Za zdolność do przenoszenia wirusa przez mszyce odpowiedzialny jest motyw DAG (Asp-Ala-Gly) w N-końcowej części białka (Harrison i Robinson, 1988; Roudet-Tavert i in., 2002; Flasiński i Cassidy, 1998). Ten motyw jest najprawdopodobniej odpowiedzialny za połączenie z białkiem HC-Pro w kłujce mszyc (Blanc i in., 1997). Kolejne funkcje białka, to udział zarówno w rozprzestrzenianiu się infekcji z komórki do komórki, jak również przez naczynia (Atreya i in., 1995; Dolja i in., 1994; Dolja i in., 1995). Przypuszcza się również, że białko CP może brać udział w regulacji replikacji wirusowego RNA (Mahajan i in., 1996).

Poza sekwencjami stanowiącymi geny kodujące białka wirusa, w genomie znajdują się również dwa regiony niekodujące:

5'NTR (*ang. non translated region*), mający długość ok. 185 nukleotydów jest bogaty w adeninę (Riechmann i in., 1992). Region ten odgrywa ważną rolę w cyklu życiowym wirusa, a w szczególności w procesie replikacji i translacji (Mazier i in., 1994). W wirionie z 5'NTR sprzężone jest kowalencyjnie białko VPg (Doroszewska, 2004).

3'NTR (*ang. non translated region*), mający długość ok. 330 nukleotydów bierze udział w inicjacji syntezy negatywnej nici RNA oraz w powstawaniu objawów chorobowych po zakażeniu patogenem (Rodriguez-Cerezo i in., 1991; van der Vlugt i in., 1992; Fakhfakh i in., 1995). Na końcu 3' regionu 3'NTR znajduje się ogon poli(A) chroniący nie RNA przed trawieniem przez egzonukleazy (Riechmann i in., 1992; Robaglia i in., 1989).

Porównanie sekwencji aminokwasowej poliprotein różnych potywirusów wskazuje, że białko P1, P3 oraz N-końcowa część białka płaszczka (CP) są najbardziej zmiennymi regionami wśród poliprotein potywirusowych (Shukla i in., 1991).

Analiza sekwencji nukleotydowej izolatów PVY-Fr (Robaglia i in., 1989) i PVY-H (Thole i in., 1993) wykazała, że stopień podobieństwa genomów jest różny w zależności od regionu. Ogólny stopień podobieństwa wyniósł 88,5%, podczas gdy regiony 5'NTR oraz P1 odpowiednio 70,3% oraz 72,6%. Porównując podobieństwo sekwencji dla genu kodującego białko płaszczka oraz sekwencji regionów kodujących białka niestrukturalne, wynoszące odpowiednio 90,6% i 80,6 %-98,3%, okazuje się, że najbardziej zmienny jest koniec 5' genomu wirusa.

2.2. Występowanie i klasyfikacja biologiczna

Pierwsze objawy nekrozy nerwów na tytoniu wywołane wirusem Y ziemniaka obserwowano w Europie już w latach 40 ubiegłego wieku (Norberga i Silberschmidt, 1944). Kolejne doniesienia pochodzą z lat 50 z Niemiec i Szwajcarii (Berger, 1958; Bode, 1958). W Polsce choroba została wykryta po raz pierwszy w 1956 roku przez prof. Jana Berbecia, a już dwa lata później wywołała epifitozę (Berbec, 1960). W roku 1971 r. został wyizolowany i opisany przez Gajosa szczep „nekrotyczny zjadliwy”- PVY^{NZ}, infekujący większość odmian tytoniu (Gajos, 1971). Chociaż szczep PVY^N znany był już od 1940 roku (Smith i Dennis, 1940), a jego występowanie na ziemniakach opisywano w Europie, Południowej Afryce, Nowej Zelandii i Peru (Singh, 1992; Ellis i in., 1997), to izolaty należące do grupy PVY^{NTN} wykryto wiele lat później (Beczner i in., 1984). Obecnie występują one powszechnie w większości krajów europejskich (Serra i Weidemann, 1997; Tomassoli i in., 1998), Libanie i Izraelu (Weidemann i Maiss, 1996), Syrii (Chikh i in., 2008), Iraku (Al-Ani i in., 2011), Południowej Ameryce (Salazar i in., 2000), Japonii (Ohshima i in., 2000; Ogawa i in., 2008), Wietnamie (Ha C i in., 2008), czy USA (McDonald i Singh, 1993; Baldauf i in., 2006; Ottoman i in., 2009; Whitworth i in., 2009). Izolaty należące do PVY^{NTN} są szczególnie groźne w uprawie ziemniaka, ponieważ oprócz obniżenia plonu, powodują nekrozy na bulwach ziemniaka, przez co zainfekowane bulwy są nieprzydatne do sprzedaży i spożycia (Crosslin i in., 2006). Na podstawie wieloletnich badań prowadzonych w IUNG-PIB we współpracy z IHAR, Oddział w Młochowie stwierdzono, że zdecydowana większość izolatów pochodzących z ziemniaka jest zdolna porażać tytoń, jak też izolaty tytoniowe zdolne są do infekcji ziemniaka. W 1994 r. w Polsce zidentyfikowano na tytoniu i ziemniaku izolaty z grupy PVY^{NTN} wywołujące nekrozy na bulwach ziemniaka (Chrzanowska, 1994). Były to pierwsze doniesienia o zdolności izolatów tytoniowych do wywoływania nekrozy bulw ziemniaka (Chrzanowska i Doroszevska, 1997).

Obecnie PVY obejmuje swym zasięgiem wszystkie kontynenty powodując duże straty w plonowaniu wielu roślin uprawnych na świecie. Wyjątkiem jest Australia, gdzie PVY dotychczas nie spowodował znaczących strat (Singh i in., 2008). Wieloletnie badania realizowane w ramach międzynarodowej organizacji CORESTA (Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco) w programie Sub-Group Collaborative Study on PVY, koordynowane przez prof. dr hab. T. Doroszevską wykazują, że największe porażenie tytoniu przez PVY miało miejsce w Szwajcarii, Niemczech, na Węgrzech, w Polsce, Macedonii, RPA i Zimbabwie (Doroszevska, 2008). Z uwagi na silne objawy nekrotyczne wywoływane przez PVY na tytoniu, surowiec pozyskany z roślin zainfekowanych nie ma

żadnej wartości przemysłowej, toteż uprawa odmian podatnych nie jest w Polsce możliwa. Efektem pracy hodowców było uzyskanie odmian zawierających określone czynniki odporności. Głównym czynnikiem odporności jest gen *va* obecny w odmianie VAM, uzyskanej na drodze kierunkowej mutacji (Koelle, 1961). Odporność ta warunkowana jest delecją genu odpowiedzialnego za podatność na PVY (Noguchi i in., 1999). Odporność oparta na podobnym mechanizmie znajduje się w większości uprawianych obecnie odmian. Niestety, odpowiedzią ze strony patogena są jego nowe formy, bardziej wirulentne, zdolne do przełamania istniejących źródeł odporności. Takie izolaty występują coraz częściej w uprawach tytoniu w Polsce i na świecie (Doroszewska, 2004; Doroszewska, 2008)

W początkach wirusologii roślinnej do rozróżniania jednostek chorobowych i wprowadzania nazewnictwa wirusów, wykorzystywane były wyraźnie widoczne objawy wywoływane na odmianach uprawnych ziemniaków (*Solanum tuberosum* L.) (Singh i in., 2008). W ówczesnym czasie cząsteczki wirusa wywołujące objawy nie były znane, dlatego nie mogły być użyte w tworzonej nazwie wirusa. Próby standaryzowania chorób wirusowych polegały na wzroście „czystych kultur choroby” w różnych odmianach ziemniaka i obserwacji wywoływanych przez nie objawów.

W 1931 r. Smith, opierając się na sposobie przenoszenia choroby oraz objawów wywoływanych przez wirusa na tytoniu, rozdzielił i nazwał te dwa komponenty wirusowe jako odpowiednio Y i X (Smith, 1931). Składnik X, który powodował na tytoniu podwójne koncentryczne kręgi z plamą w środku, nazywany był ringspot. Składnik Y – przenoszony przez mszyce, na tytoniu wywoływał ściemnienia wzdłuż nerwów liści. W ten sposób składniki te dały podstawę nazwy dla wirusa X ziemniaka (PVX) oraz dla wirusa Y ziemniaka (PVY). Od nazwy tych wirusów pochodzi nazwa dwóch rodzajów w obecnej taksonomii wirusów: *Potexvirus* i *Potyvirus* (Fauquet i in., 2005).

Nomenklaturę wykorzystującą pojedynczą literę alfabetu wykorzystano również do nazwania innych wirusów ziemniaczanych i tak: wirus mozaiki fałdowanej nazwano PVA (Murphy i Mackay, 1932), wirus liściowy ziemniaka – PVD (Bawden, 1934), wirus wierzchołka pędu – PVB i PVC (Bawden, 1936). W latach pięćdziesiątych XX wieku, wirus mozaiki międzynerwowej nazwano PVM (Bagnall i in., 1956), a wirus wcześniej nazwany jako wirus E ziemniaka (PVE) (Dykstra, 1939) oraz wirus K ziemniaka (PVK) (Köhler, 1942) nazwano wspólnie wirusem M ziemniaka (PVM). Dodatkowo wirus wcześniej zaliczany do PVM został nazwany wirusem S ziemniaka (PVS) od nazwiska Slogteren – uczonego, który jako pierwszy odkrył tego wirusa (Rozendaal i Brust, 1955). Niektóre z wczesnych nazw

wirusów dzisiaj już nie funkcjonują. Dla przykładu PVB i PVC, które obecnie stanowią szczepy w obrębie odpowiednio: PVX i PVY (Singh i in., 2008).

W początkach badań nad PVY zaobserwowano, że objawy wywoływane przez patogena na ziemniakach różnią się intensywnością zależnie od odmiany (Bawden i Kassanis, 1946; Cockerham, 1943). W późniejszym okresie wprowadzono do nomenklatury drugą literę alfabetu pisaną w indeksie górnym dla rozróżnienia szczepów w obrębie wirusa. Do rozróżniania poszczególnych szczepów, wykorzystywano zdolność izolatu lub jej brak do wywoływania nekroz wierzchołka pędu u różnych odmian ziemniaków oraz nekroz systemicznych na tytoniu. Wczesne badania nad odpornością na niektóre wirusy w uprawianych ziemniakach wykazały że cechy te są dziedziczone jednogenowo i mają dominujący charakter (Cadman, 1942; Cockerham, 1943; Hutton, 1945; Jones, 1990). W ten sposób użycie różnych odmian ziemniaka pozwoliło na rozróżnianie wirusów na podstawie wysokoczułej reakcji odpornościowej (*ang. Hypersensitive resistance response – HR*), ujawniającej się poprzez lokalny rozwój zmian nekrotycznych na zakażanych liściach, które przekształcały się bądź nie, w nekrozy systemiczne (Singh i in., 2008). Dla przykładu wirus PVA został wyodrębniony ponieważ nekrozy wierzchołka pędu korespondowały z występowaniem genu *Na*, PVB z genem *Nb*, PVC (obecnie PVY^C) z genem *Nc*, a PVY (obecnie PVY^O) z genem *Ny*. Kiedy opisane powyżej geny HR zostały odkryte i nazwane, nie uświadamiano sobie jeszcze, że PVC (obecnie PVY^C) i PVY (obecnie PVY^O), to 2 różne szczepy jednego gatunku wirusa – wirusa Y ziemniaka (PVY) (Singh i in., 2008).

W 1961 roku został opisany po raz pierwszy nowy szczep PVY, który nie był zdolny do wywoływania odpowiedzi warunkowanej przez geny HR w ziemniaku, ale powodował nekrozy na tytoniu. Został on nazwany szczepem nekrotycznym PVY^N (De Bokx, 1961). Wiele lat później, w 1990 roku opisano nowy szczep – PVY^Z, który nie był zdolny do wywoływania nekroz na tytoniu i jednocześnie nie należał do PVY^C ani do PVY^O (Jones, 1990).

Wirus Y ziemniaka jest patogenem również innych niż ziemniaki roślin uprawnych: papryki (*Capsicum* spp.), pomidora (*Solanum lycopersicum* L.) i tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.). Niektóre izolaty infekujące paprykę porażają również ziemniaki (Gébré-Selassie i in., 1985; Romero i in., 2001). Zaproponowano nawet metodę odróżniania typowych izolatów paprykowych poprzez zakażanie tytoniu odmiany Xanthi (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) (Romero i in., 2001). Biologiczne różnice pomiędzy izolatami paprykowymi i ziemniaczanymi dają się zauważyć na podstawie różnic w sekwencji nukleotydowej genomu izolatów wirusa. Ponadto dość znacznie różnią się sekwencje genu kodującego białko

płaszczka (CP), dlatego odróżnianie tych izolatów jest możliwe również poprzez testy serologiczne z wykorzystaniem odpowiednich przeciwciał monoklonalnych (Soto i in., 1994) oraz restrykcję i analizę filogenetyczną sekwencji genomu izolatów wirusa (Romero i in., 2001).

Wiele izolatów pochodzących z papryki jest bardzo podobnych do szczepu PVY^C pochodzącego od ziemniaka (Fanigliulo i in., 2005; Romero i in., 2001). Duża zmienność cech biologicznych izolatów pochodzących z papryki w odniesieniu do sekwencji genu kodującego białko płaszczka wskazuje, że istnieje tutaj jeden szczep genetyczny. Izolaty należące do szczepu PVY^C pochodzące z ziemniaków wykazują zaś jednolite cechy biologiczne, ale w oparciu o analizę sekwencji genu białka płaszczka udało się wyróżnić w ich obrębie 2 szczepy genetyczne PVY^{C1} i PVY^{C2} (Blanco-Urgoiti i in., 1998a).

Izolaty infekujące paprykę w warunkach polowych były oryginalnie zaliczane do trzech głównych grup (patotypów), w oparciu o zdolność do przełamania recesywnych genów odporności *pvr2*¹ i *pvr2*² (Singh i in., 2008). Izolaty zdolne do przełamania tych genów i zdolne infekować rośliny nie posiadające tych genów zaliczane były do patotypu 0. Izolaty, które przełamywały *pvr2*¹ zaliczano do patotypu (0,1), natomiast izolaty przełamujące odporność warunkowaną przez obydwa geny do patotypu (0,1,2) (Gébré-Selassie i in., 1985). Jednakże *pvr2*¹ i *pvr2*² były później określone jako allele tego samego genu, ponadto dodatkowo odkryto trzeci allele *pvr2*³ (Singh i in., 2008). Allele genu *pvr2*, które nie odpowiadają za odporność na PVY nazwano *pvr2*⁺ (Moury i in., 2004). Odporność warunkowana recesywnymi allelami genu *pvr2* nie jest związana z reakcją rośliny po zainfekowaniu przez PVY, w odróżnieniu od odporności u ziemniaków, która ma charakter dominujących genów *Ny* i *Nc* – specyficznych dla odpowiednio: PVY^O i PVY^C. Oczywiście istnieją w papryce również inne geny o charakterze dominującym bądź recesywnym (Arnedo-Arnés i in., 2006; Kyle i Palloix, 1997), ale wyżej wymienione nazewnictwo patotypów wciąż jest używane. Na papryce PVY może wywoływać miejscowe nekrotyczne zmiany, systemiczną nekrozę nerwów oraz nekrozę wierzchołków. Interakcje pomiędzy czterema allelami genu *pvr2* (*pvr2*⁺, *pvr2*¹, *pvr2*², *pvr2*³) są zależne od 23-aminokwasowego regionu wirusowego białka VPg, połączonego z genomem wirusa (Ayme i in., 2007). Allele genu *pvr2* są wariantami sekwencji kodujących eukariotyczny czynnik 4E inicjacji translacji (eIF4E). Mutacje w VPg i eIF4E wpływają na interakcje pomiędzy tymi białkami, w wyniku czego upośledzony zostaje cykl infekcyjny wirusa i nie jest on w stanie namnażać się w zainfekowanych tkankach (Ayme i in., 2007; Ruffel i in., 2005). Ponieważ zidentyfikowano zależności pomiędzy genami wirusa i rośliny gospodarza uznano, iż powinno stać się możliwe

użycie sekwencji VPg do ustalenia przynależności izolatów wirusa do odpowiednich patotypów (Singh i in., 2008). I rzeczywiście wiedza dotycząca zmienności sekwencji białka VPg, wirulencji izolatów wirusa infekujących paprykę niosącą różne allele genu *pvr2*, pozwoliła na rozróżnienie w sumie 8 patotypów zamiast rozpoznanych początkowo 3 (Ayme i in., 2007).

Ziemniaki i papryka jako żywicieli są selektywne w stosunku do różnych szczepów wirusa, natomiast pomidor i tytoń mogą być infekowane przez większość izolatów pochodzących z ziemniaków i papryki (Aramburu i in., 2006; Stobbs i in., 1994). Dlatego bardzo trudno o kryteria, za pomocą których można byłoby przyporządkować szczepy pochodzące z pomidora, do któregoś ze szczepu ziemniaczanego lub paprykowego. Dla przykładu przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko szczepom O, N i C nie zapewniają odpowiedniego grupowania izolatów pomidorowych w odniesieniu do charakterystyki biologicznej (Aramburu i in., 2006). Analiza sekwencji izolatów pozyskanych z pomidorów wykazała, że można je przyporządkować do 3 grup: N, NTN oraz innych izolatów nie pochodzących z ziemniaka (Aramburu i in., 2006).

Tytoń infekowany jest przez wszystkie szczepy PVY (Chachulska i in., 1997a). W 1974 roku zidentyfikowano w Polsce na odmianie ziemniaka Nysa – izolat PVY^NNy należący do szczepu PVY^N (Chrzanowska, 1991). Z wyjątkiem nekrotycznego szczepu PVY^N, pozostałe wywołują objawy mozaikowe (Romero i in., 2001). Przedstawicielem szczepu PVY^O jest polski izolat PVY^OLW wyizolowany w 1970 roku z odmiany ziemniaka – Lipińskie Wczesne (Chrzanowska, 1991).

W USA bazując na charakterze nekrotycznych objawów jakie izolaty PVY wywołują na tytoniu podzielono je na 3 szczepy (Gooding i Tolin, 1973). Izolaty należące do szczepu M^SN^R zwanego również MsNr lub MN wywołują nekrozy na roślinach tytoniu, które posiadają dominujący allel genu odporności na nicienie *Rk*. Izolaty szczepu M^SM^R (MM) powodują objawy mozaiki, a izolaty należące do szczepu N^SN^R (NN) wywołują nekrozy niezależnie od genu *Rk* (Gooding i Tolin, 1973). Związek między odpornością na nicienie zależną od genu *Rk* i objawami nekrotycznymi wywoływany przez szczep M^SN^R jest tak silny, że inokulacja liści tytoniu tym szczepem jest wykorzystywana w skryningu linii hodowlanych odpornych na nicienie (Yi i in., 1998).

Prawdopodobnym jest, że w genotypach tytoniu posiadających gen *Rk* za powstawanie nekroz odpowiedzialna jest replikaza NlB, chociaż jak wskazują autorzy (Fellers i in., 2002) wymaga to potwierdzenia przez analizę mutacji w infekcyjnych klonach PVY. Istnieje mało informacji na temat: w jaki sposób izolaty PVY należące do szczepów zdefiniowanych na

podstawie reakcji na gen *Rk*, mogłyby odpowiadać genom *Ny*, *Nc* lub *Nz* w ziemniakach. Analiza filogenetyczna sekwencji kodującej białko płaszczka (CP) wskazuje, że izolaty należące do szczepów $M^S N^R$ oraz $N^S N^R$ są najbardziej zbliżone do szczepu PVY^C (Boonham i in., 2002; Lorenzen i in., 2006a).

We Francji opisano trzy szczepy nekrotyczne PVY: Typ1, Typ2, Typ3 oraz zaproponowano nową klasyfikację opartą na zdolności przełamania odporności tytoniu warunkowanej bądź przez pojedynczy recesywny gen *va*, bądź przez częściowo dominujący gen *VR* (Blancard i in., 1994; Blancard i in., 1995). Typ 1 – zbliżony do szczepu MM, wywołuje głównie objawy typu mozaikowego, Typ 2 – nekrotyczny dla tytoniu, szczególnie dla odmiany NCTG52, co odróżnia ten szczep od szczepu amerykańskiego NN; Typ 3 – wywołuje nekrozy u genotypów zawierających gen *va* i *VR* (Blancard i in., 1994).

Wywołanie na tytoniu lokalnych i systemicznych nekroz nerwów liści i czasami nekroz łodyg w odróżnieniu od objawów mozaiki pozwala na rozróżnienie izolatów ziemniaczanych na dwa szczepy lub patotypy. Grupowanie izolatów oparte na analizie filogenetycznej sekwencji genu kodującego białko płaszczka jest skorelowane z nekrotycznymi i mozaikowymi objawami fenotypowymi wywoływanymi przez te izolaty (Chikh i in., 2007a; Li i in., 2006; Van der Vlugt i in., 1993). Analiza sekwencji wykazała, że region kodujący białko HC-Pro zawiera ważne determinanty odpowiedzialne za powstawanie nekroz na tytoniu (Tribodet i in., 2005), ale nie muszą one być jedynymi determinantami tego zjawiska (Schubert i in., 2007).

W latach czterdziestych i pięćdziesiątych XX wieku pojawiły się w południowej Afryce i Europie izolaty PVY zdolne do wywoływania nekroz nerwów liści tytoniu i łagodnych plam na większości ziemniaków i były one określane jako „necroses das nervuras” (Orlando i Silberschmidt, 1945), wirus nekrozy nerwów (Bawden i Kassanis, 1946), szczep brązowienia nerwów tytoniu (Arenz i Hunnius, 1959), szczep „Rippenbräune” Y^R (Nienhaus, 1960), szczep nekrotyczny Y^R (Horváth, 1967; Köhler, 1960). Keller i Münster (Keller i Münster, 1961) wprowadzili oznaczenie Y^N dla określenia szczepu wywołującego nekrozę nerwów na tytoniu, chociaż w tym samym czasie Nienhaus (1960) oznaczenia Y^N używał dla określenia szczepu normalnego. Jednocześnie szczep PVY^N odkryty w USA w dwóch próbkach ziemniaków pochodzących z Boliwii, został nazwany PVY -TVN – wywołującym nekrozy nerwów na tytoniu (ang. tobacco veinal necrosis strain of PVY) (Kahn i Monroe, 1963). Szczep PVY^N wywołuje nekrozy na tytoniu, ale nie powoduje ich powstawania na odmianach ziemniaków niosących geny *Nc* lub *Ny*. Wydaje się, że zdolność do przełamania tych dwóch genów jest połączona ze zdolnością do wywoływania nekroz na

tytoniu. Jednakże wciąż jest zbyt mało informacji aby stwierdzić, że wszystkie izolaty, które na tytoniu wywołują nekrozy, są jednocześnie zawsze zdolne do przełamania wcześniej wspomnianych genów wysokoczułej reakcji odpornościowej (HR) w ziemniakach (Singh i in., 2008).

Nową grupę izolatów należącą do szczepu PVY^N wykryto w latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku. Izolaty z tej grupy wywoływały chorobę nekrotycznej pierścieniowej plamistości bulw ziemniaka (ang. potato tuber ringspot necrotic disease PTNRD) (Beczner i in., 1984; Kerlan i Le Romancer, 1992; Kus, 1995). Izolaty te na początku nazwane PVY^{NN} (Kerlan i Le Romancer, 1992), ostatecznie zostały określone jako PVY^{NTN} (Le Romancer i in., 1994). Inna grupa izolatów należących do szczepu PVY^N została po raz pierwszy zaobserwowana w Polsce na ziemniaku odmiany Wilga i nazwana PVY^{N-Wi} (Chrzanowska, 1991), obecnie zaliczana do grupy PVY^{NW} (w Ameryce Północnej – PVY^{N:O}). Profesor Chrzanowska wykorzystując przeciwciała firmy Bioreba, stwierdziła, że szczep PVY^N jest niejednorodny (Chrzanowska, 1994). Pomimo użycia przeciwciał skierowanych przeciwko szczepowi PVY^N, część izolatów wirusa była niewykrywalna.

Glais i in. badając fragment 5'NTR-P1 wykonali analizę filogenetyczną i na jej podstawie wykreślili dendrogram, w którym izolaty PVY zostały podzielone na 3 klastry (Glais i in., 1999). Na pierwszy składały się izolaty tylko PVY^N, drugi stanowiły zarówno PVY^{NW} jak i PVY^{NTN}, zaś trzeci izolaty PVY^O. Na podstawie wzorów restrykcyjnych otrzymanych po trawieniu genu P3 wyłoniono 2 grupy. Pierwszą grupę z izolatami tylko PVY^N i drugą z izolatami należącymi do PVY^{NTN}, PVY^{NW} oraz PVY^O. Na podstawie wzorów restrykcyjnych otrzymanych po niezależnych trawieniach genu NIa oraz CP wyodrębniono dwie grupy izolatów. Pierwszą stanowiły PVY^N i PVY^{NTN}, zaś drugą PVY^{NW} oraz PVY^O. Analiza filogenetyczna izolatów PVY^{NW}, wykazała że geny znajdujące się w 5'-połowie genomu, grupowane są razem z odpowiednimi genami izolatów PVY^{NTN}, podczas gdy geny znajdujące się w 3'-połowie genomu wykazują podobieństwo do genów izolatów należących do szczepu PVY^O. Na tej podstawie stwierdzono, że izolaty PVY^{NW} powstały w drodze rekombinacji pomiędzy szczepami PVY^N i PVY^O (Glais i in., 1999). Wśród izolatów PVY^{NTN} i PVY^{NW} wykazano, że w 5'-połowie genomu, miejsce rekombinacji zlokalizowane jest albo pomiędzy genem P3, a HC-Pro albo między HC-Pro i rejonem 5'NTR-P1. Ponadto, tylko u PVY^{NTN} stwierdzono drugie miejsce rekombinacji, które zlokalizowane było w 3'-połowie genomu wirusa albo pomiędzy genem P3 i CI, albo między CI i NIa (Glais i in., 1999). Później zauważono, że miejsce rekombinacji w rejonie 3'-końca genu HC-Pro polskiego izolatu PVY^{N-Wi} należącego do grupy PVY^{NW}, jest identyczne z miejscami

rekombinacji występującymi w grupie izolatów PVY^{NTN} – węgierskim PVY^{NTN}-H oraz słoweńskim PVY^{NTN}-Slo (Barker i in., 2009).

Najbardziej charakterystyczną cechą izolatów z grupy PVY^{NTN} jest zdolność do wywoływania choroby nekrotycznej pierścieniowej plamistości bulw ziemniaka (PTNRD), jednak ta cecha jest wysoce zmienna. Dla przykładu zakażeniu izolatami PVY^{NTN} nie zawsze towarzyszy pojawianie się nekrotycznych pierścieniowych plamistości na bulwach pomimo 50-70% zainfekowanych roślin w warunkach polowych np. na odmianach Mona Lisa i Rosalie (Beczner i in., 1984). Podobnie brazylijskie odmiany Agata, Achat, Atlantic, Asterix, Baraka, Manjke i Vivaldi oraz niemieckie Nicola, Linda, Belldonna i Nadine mogą wykazywać objawy nekrotyczne na bulwach (Singh i in., 2008). Nawet spośród 11 izolatów określonych za pomocą technik molekularnych jako PVY^{NTN}, którymi zakażano wysoce podatną odmianę ziemniaka Nadine, tylko jeden wywołał objawy choroby nekrotycznej pierścieniowej plamistości bulw ziemniaka (PTNRD) w warunkach szklarniowych (Xu i in., 2005). Z drugiej strony niektóre izolaty szczepu PVY^N, które zostały pozyskane z bulw nie wykazujących żadnych objawów PTNRD w warunkach polowych, wykorzystane w badaniach prowadzonych w warunkach szklarniowych wywoływały chorobę nekrotycznej pierścieniowej plamistości bulw ziemniaka (Browning i in., 2004). Co więcej, również izolaty z grupy PVY^{NW} dotąd uznawane za niezdolne do wywoływania PTNRD, mogą wywoływać zmiany nekrotyczne na bulwach wysoce wrażliwych odmian ziemniaka np. Yukon Gold (Baldauf i in., 2006; Piche i in., 2004; Schubert i in., 2007). Podobnie izolaty PVY^N pochodzące z Nowej Zelandii i wykazujące typową nie zrekombinowaną strukturę molekularną szczepu PVY^N, są w stanie powodować zmiany nekrotyczne na bulwach wysoce wrażliwej odmiany Nadine (Schubert i in., 2007).

W USA w 1996 roku na 300 przebadanych próbek tylko dwie sklasyfikowano jako PVY^{NW} – pozostałe należały do szczepu PVY^O (McDonald i Singh, 1996). W roku 2000 PVY^{NW} stanowiły 64%, a w 2001 roku 90% ogółu przebadanych izolatów (Singh i in., 2003).

Wraz z odkryciem izolatów PVY^{NTN} w różnych krajach europejskich (Beczner i in., 1984; Kerlan i Le Romancer, 1992), Azji (Oshima i in., 2000) oraz w Ameryce Północnej (McDonald i Kristjanson, 1993; Singh, 1992) pojawił się pomysł wprowadzenia nowego nazewnictwa opartego na charakterystyce serologicznej i molekularnej. W tworzeniu obecnej nomenklatury uwzględniane są cechy biologiczne, serologiczne i molekularne. Charakterystyka molekularna pozwoliła określić niektóre izolaty PVY^{NTN} jako będące rekombinantami szczepów PVY^O i PVY^N, w obrębie genu CP (Boonham i in., 1999;

Boonham i in., 2002; Glais i in., 1998; Revers i in., 1996), HC-Pro, NIa i NIb (Glais i in., 2002), ale inne pochodzące z Ameryki Północnej, Danii, Nowej Zelandii, Niemiec, Polski, czy Japonii wywołujące chorobę nekrotycznej pierścieniowej plamistości bulw ziemniaka (PTNRD) nie posiadały zrekombinowanego genu CP (Boonham i in., 2002; Oshima i in., 2000; Schubert i in., 2007). Północno-amerykańskie izolaty PVY^{NTN} nie wykrywane przez zestaw starterów opracowanych dla europejskich izolatów PVY^{NTN} nazwane zostały jako North American PVY^{NTN} (Weilguny i Singh, 1998) lub NA-PVY^{NTN} (Nie i Singh, 2002b).

Izolaty PVY^{NW} mogą posiadać jedno miejsce rekombinacji (Nie i Singh, 2002b; Nie i in., 2003) lub dwa miejsca rekombinacji (Glais i in., 2002). Rzadziej występują izolaty posiadające trzy lub cztery miejsca rekombinacji (Singh i in., 2008; Schubert i in., 2007; Lorenzen i in., 2008). W Hiszpanii zidentyfikowano izolat w odmianie Maris Bard ziemniaka, wykazujący podobieństwo wzorów restrykcyjnych do szczepu PVY^N, ale wykrywalny przez przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw szczepowi PVY^O i jednocześnie nie wywołujący nekroz na nerwach tytoniu oraz przełamujący odporność warunkowaną genami HR (*Ny*, *Nc*, *Nz*). Izolaty te nazwano PVY^{ZE} (Kerlan i in., 1999) i sklasyfikowano jako wariant szczepu PVY^Z. Jednakże odkąd gen *Nz* nie rozpoznaje tych izolatów wycofano się z użycia litery „Z” w zapisie i zaproponowano nową nazwę PVY^E (Singh i in., 2008).

Reasumując, zarówno różnice w rodzaju wywoływanych objawów (mozaiki, nekrozy nerwów tytoniu) jak i reakcja ziemniaka niosącego geny HR wpłynęły na wyznaczenie szczepów PVY: PVY^O, PVY^C, PVY^N, PVY^Z (De Bokx i Huttinga, 1981; Jones, 1990; Singh i in., 2008). Pojawienie się izolatów w obrębie szczepu PVY^N zdolnych do wywoływania zmian nekrotycznych na bulwach ziemniaka wymusiło zastosowanie metod serologicznych i molekularnych do wydzielenia dwóch grup: PVY^{NW} i PVY^{NTN}. W efekcie badania prowadzone technikami molekularnymi ujawniły wzrastającą liczbę zrekombinowanych izolatów, w których genomach znajdują się fragmenty pochodzące od różnych szczepów. Jedynie szczep PVY^O został zaproponowany wyłącznie bazując na testach serologicznych z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych. Jednakże wykrywanie poszczególnych szczepów PVY przy pomocy tej techniki nie jest do końca precyzyjne. Epitopy, występujące na białku płaszczka wirusa poszczególnych szczepów (PVY^O, PVY^C, PVY^N, PVY^Z, PVY^E), rozpoznawalne przez przeciwciała monoklonalne nie zostały jak dotąd do końca poznane. Chociaż ostatnio udało się określić determinantę odpowiedzialną za wykrywanie przez przeciwciało anti-PVY^O, izolatów należących do PVY^N. Chikh i in. (2007a) wykazali, że mutacja w pozycji 8652 genomu z A na G skutkuje zmianą aminokwasu wchodzącego w skład białka płaszczka z Glu29 na Gly29. Obecność w pozycji 29 białka płaszczka – glicyny,

pomimo tego, że pozostałe pozycje aminokwasowe były identyczne z nie zmutowanym białkiem płaszcza szczepu PVY^N, powodowało reakcje nie tylko z przeciwciałami anti-PVY^N, ale również z przeciwciałami anti-PVY^O.

Od późnych lat siedemdziesiątych rozwijano metody wykrywania i rozróżniania szczepów PVY opartych na interakcji przeciwciało-antygen. Wykorzystywano w tym celu zarówno technikę DAS-ELISA, ale również TAS-ELISA (ang. triple antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay) (Gugerli i Fries, 1983; Oshima i in., 1990; Sanz i in., 1990; Singh i in., 1993; Ellis in., 1996; Boonham i Baker 1998; Ounouna i in., 2002). Pojawienie się nowych wariantów wirusa – PVY^{NTN} (Le Romancer i in., 1994; Kerlan i in., 1999) i PVY^{NW} (Chrzanowska, 1991) ograniczyło wykorzystanie dostępnych metod serologicznych. W 2008 roku w Czechach opracowano metodę produkcji przeciwciał poliklonalnych skierowanych przeciwko zrekombinowanemu białku płaszcza szczepu PVY^{NW} (Folwarczna i in., 2008). Przeciwciała te rozpoznawały szczepy PVY^O, PVY^N, PVY^{NW} i PVY^{NTN}. Mogą one być wykorzystane zarówno w technice Western Blotting jak i ELISA, z tym, że w przypadku tej ostatniej tylko do jednej z odmian ELISA - IPTA (ang. indirect plate trapped antigen). Jest to spowodowane brakiem zdolności tych przeciwciał do opłaszczania mikroplątek (Folwarczna i in., 2008). W ostatnim czasie zaproponowano metodę MIA (ang. multiplex microsphere immunoassay) do jednoczesnego rozróżniania kilku różnych wirusów (PVY, PVX, PLRV). Technika oparta była na technologii xMAP[®] firmy Luminex. Zaletą tej technologii jest możliwość jednoczesnego wykrywania kilku antygenów, w odróżnieniu od techniki DAS-ELISA, gdzie identyfikuje się tylko jeden antygen (Bergervoet i in., 2008). Do jednoczesnego rozróżniania kilku wirusów: wirusa mozaiki ogórka (CMV), wirusa mozaiki pomidora (ToMV) i PVY zaproponowano również metodę opartą o technikę cytometrii przepływową, ze znakowaniem przeciwciał fikoerytryną (PE) i fluoresceiną (FITC) (Ianelli i in., 1997). Ponadto do jednoczesnego oznaczania PLRV, PVA, PVX i PVY może być także użyta technika real-time PCR z zastosowaniem sond TaqMan[®] (Agindotan i in., 2007). W 1994 roku Watts i Singh zaproponowali izoelektryczne ogniskowanie (CA-IEF), jako metodę do rozróżniania szczepów PVY^N i PVY^O. W tym celu oczyszczone wiriony puszczano na żelu denaturującym, z gradientem pH od 3,5 do 10. Białko płaszcza szczepu PVY^N ma charakter kwaśny, dlatego punkt izoelektryczny ustalono na pI=6,1, podczas gdy bardziej zasadowe białko CP szczepu PVY^O posiadało 3 różne punkty izoelektryczne pI=6,8; 7,2 i 7,4 (Watts i Singh, 1994). Ponieważ punkty izoelektryczne dla poszczególnych szczepów różniły się znacznie, można uznać, że metoda ta może być przydatna do ich rozróżniania.

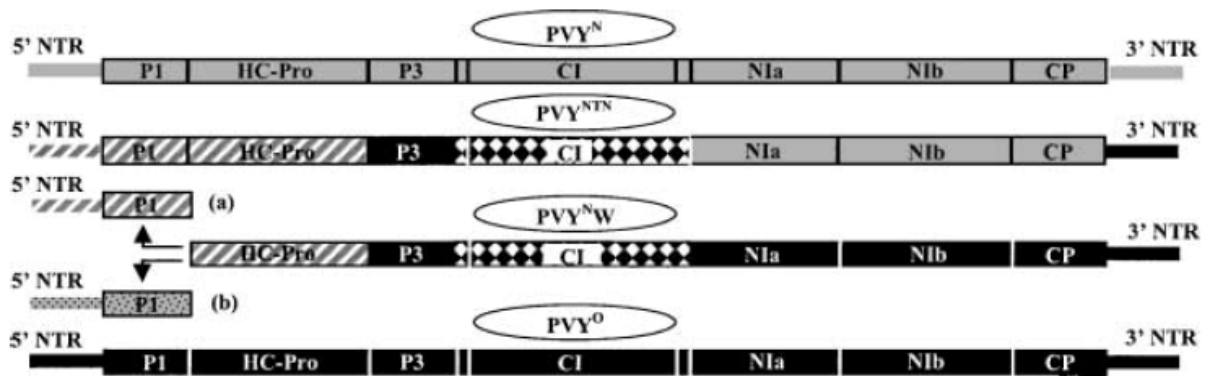
Wykorzystanie zjawiska dużej zmienności w obrębie genu P1 pozwoliło wykorzystać technikę RT-PCR do rozróżniania poszczególnych szczepów PVY (Tordo i in., 1995). Metody oparte na zmienności w sekwencji genu P1, umożliwiły odróżnienie europejskiego szczepu PVY^{N/NTN} od północno-amerykańskiego PVY^{N/NTN} (Singh i in., 1998; Weilguny i Singh, 1998). Zastosowanie starterów S6 i S7 w multipleksowym RT-PCR pozwoliło na rozróżnienie szczepów odpowiednio PVY^{NTN} i PVY^O (Nie i Singh, 2002b). W przypadku szczepu PVY^{NTN} generowany był produkt o długości 443bp, podczas gdy dla szczepu PVY^O powstawał produkt 281bp (Singh i in., 2003). Co więcej, okazało się, że w badanych próbkach zdarzają się jednoczesne zakażenia przez dwa szczepy – zarówno PVY^O jak i PVY^{NTN} (Singh i in., 2003). Singh i współpracownicy zaproponowali reakcję duplex RT-PCR do jednoczesnego wykrywania wirusa Y ziemniaka (PVY) i wirusa liściozwoju ziemniaka (PLRV) (Singh i in., 2000). Niezależnie od siebie Lorenzen i Nie zaproponowali do rozróżniania izolatów należących do różnych szczepów i grup – PVY^N, PVY^{NTN}, PVY^{NW} i PVY^O, wykorzystanie jednej reakcji multiplex PCR (Lorenzen i in., 2006b; Nie i Singh, 2003a). Dzięki niej można było rozróżniać izolaty nawet w mieszanych infekcjach. Również Rigotti i Gugerli zastosowali multipleksowaną reakcję PCR. Dzięki odpowiednio dobranym starterom byli w stanie określić poza PVY^{NTN}, PVY^{NW} i PVY^O również PVY^C (Rigotti i Gugerli, 2007). Ciekawą metodę wykorzystał także Xianzhou Nie. Zaproponowana przez niego zapętlona izotermiczna amplifikacja DNA (RT-LAMP) oparta o różnice w sekwencji genu CP pozwalała rozróżnić izolaty PVY należące do różnych grup taksonomicznych (Nie, 2005). W 2008 roku zaproponowano wykorzystanie techniki reverse transcription real-time PCR do detekcji i rozróżniania izolatów PVY (Kogovšek i in., 2008). Kolejna metoda zaproponowana do oznaczania szczepów PVY polegała na hybrydacji specyficznych oligonukleotydów do transkrypcyjnego RNA otrzymanego na matrycy DNA z uprzedniej amplifikacji fragmentu genomu wirusa i opóźnieniu migracji owej hybrydy w żelu agarozowym w procesie elektroforezy (Rosner i Maslenin, 2001; Rosner i Maslenin, 2003). Po opublikowaniu molekularnych determinantów odpowiedzialnych za powstawanie nekroz nerwów liści tytoniu (Tribodet i in., 2005), w niezależnie prowadzonych od siebie badaniach Jacquot i Balme-Sinibaldi wykorzystali technikę TaqMan[®] opartą na polimorfizmie pojedynczego nukleotydu (SNP) w genie HC-Pro do rozróżniania izolatów należących do szczepów PVY^N od PVY^O (Jacquot i in., 2005; Balme-Sinibaldi i in., 2006). Zaproponowana technika była czuła, łatwa do zastosowania i szybka, ponieważ eliminowała czasochłonny etap elektroforezy (Jacquot i in., 2005). O krok dalej poszedł w 2007 roku Rolland,


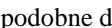



wykorzystując technikę SNaPshot. Dzięki jej zastosowaniu możliwe stało się rozróżnianie już nie tylko PVY^N od PVY^O, ale również PVY^{NTN} i PVY^{NW} (Rolland i in., 2008).

Wykrywanie izolatów PVY^{NTN} oparte o reakcje RT-PCR z wykorzystaniem starterów zaproponowanych przez europejskich naukowców, często prowadzi do wykrywania izolatów tylko europejskich, podczas gdy północno-amerykańskie nie są wykrywane (Nie i Singh, 2002a). Dla określenia podłoża molekularnego tego zjawiska ustalono sekwencję rejonu 5'NTR oraz genu P1 – 11 izolatów zarówno PVY^N jak i PVY^{NTN} z obszaru Europy i Ameryki Północnej. Porównanie sekwencji oraz wykonanie analizy filogenetycznej pozwoliło stwierdzić, że izolaty z tych dwóch obszarów geograficznych tworzą swoje odrębne grupy (Nie i Singh, 2002a). W efekcie opracowano zestaw starterów reakcji PCR do wykrywania północno-amerykańskich izolatów PVY. W Indiach przeprowadzono badania oparte na sekwencjonowaniu genomów izolatów PVY pozyskanych z obszaru Indii i Chin. Na ich podstawie stwierdzono, że izolaty występujące w tych krajach wykazują większe podobieństwo sekwencji w stosunku do izolatów europejskich, aniżeli do północno-amerykańskich (Mukherjee i in., 2004).

W Hiszpanii po przeprowadzeniu badań 38 izolatów PVY pochodzących z Europy zachodniej, które scharakteryzowano biologicznie, serologicznie i z zastosowaniem technik molekularnych, stwierdzono, że zastosowanie tylko jednej techniki nie pozwala na rozróżnienie badanych izolatów, lecz konieczne staje się zastosowanie kilku jednocześnie (Blanco-Urgoiti i in., 1998b).

W 1997 r. przy wykorzystaniu odwrotnej transkryptazy AMV-RT pochodzącej z wirusa mieloblastozy ptaków udało się otrzymać cDNA pełnej długości na matrycy RNA wirusowego (Chachulska i in., 1997b). Pozwoliło to następnie na badanie polimorfizmu całego genomu wirusa metodą RFLP. Glais przebadał na poziomie molekularnym 14 izolatów PVY należących do PVY^O, PVY^N, PVY^{NTN} i PVY^{NW}. W badaniach tych wykonano trawienia RFLP genów każdego z izolatów oraz zsekwencjonowano pierwsze 2700 nukleotydów dwóch izolatów PVY^{NW} (Glais i in., 2002). Mozaikowa struktura genomu została stwierdzona zarówno w przypadku izolatów PVY^{NW} jak i PVY^{NTN}, które w zależności od genu wykazywały sekwencję albo taką jak PVY^O, albo jak PVY^N. Idąc od końca 5' w obrębie końca 3' genu HC-Pro, następuje przełączenie z sekwencji typowej dla PVY^N na sekwencję typową dla PVY^O. Wśród izolatów PVY^{NTN} obserwowany był powrót od końca 5' genu NIa do sekwencji typowej dla PVY^N i ponowne przełączenie do sekwencji typowej dla PVY^O w końcu 3' genu CP (rys. 4) (Glais i in., 2002).



Rys. 4. Mapa genomu czterech różnych grup PVY (PVY^N , PVY^{NTN} , PVY^{NW} i PVY^O). PVY^N - ; podobne do PVY^N - ; PVY^O - ; podobne do PVY^O - ; niezdefiniowane -  (Glais i in., 2002)

Zaobserwowano również izolaty PVY^{NW} , które przełączały swoją sekwencję z typowej dla PVY^O na PVY^N w obrębie genu P1, co pozwala wśród grupy PVY^{NW} dodatkowo wyróżnić 2 podgrupy.

Podobne badania nad zrekombinowanymi formami wirusa – PVY^{NTN} i $PVY^{N:O}$ (PVY^{NW}) przeprowadził w USA Lorenzen i współpracownicy, wykorzystując jako materiał badawczy izolaty północno-amerykańskie (Lorenzen i in., 2006). Stopień homologii badanych izolatów w stosunku do izolatów europejskich oscylował w okolicach 99%, co oznaczałoby, że zrekombinowane formy europejskie i amerykańskie miały wspólnych przodków (Lorenzen i in., 2006), jednak Schubert i in. (2007) w swoich badaniach dowodzi, że północno-amerykańskie izolaty PVY^{NTN} (NA- PVY^{NTN}) znacznie różnią się od europejskich izolatów PVY^{NTN} i stwierdza, że o ile europejskie grupy PVY^{NW} i PVY^{NTN} powstały przez rekombinację pomiędzy szczepami PVY^N i PVY^O , o tyle NA- PVY^{NTN} musiały powstać przez rekombinację pomiędzy szczepem PVY^N , a nieznanym szczepem PVY lub innym potywirusem. Doniesienia Schuberta zdają się potwierdzać wyniki badań przeprowadzonych w Kanadzie przez Nie i Singh. Prowadzone badania oparte były na sekwencji rejonu 5'NTR i genu P1. Izolaty należące do szczepu PVY^N i grupy PVY^{NTN} , w wyniku analizy filogenetycznej utworzyły dwie odrębne grupy: europejską i północno-amerykańską (Nie i Singh, 2002). Stopień homologii w obrębie grupy wynosił ponad 98%, podczas gdy między grupami oscylował około 90% (Nie i Singh, 2002).

W 2008 roku Lorenzen opisuje nowy izolat oznaczony symbolem NE-11, który stanowi pośrednie ogniwo pomiędzy szczepem PVY^N , a NA- PVY^N (Lorenzen i in., 2008). Pierwsze 2000 nukleotydów tego izolatu posiada sekwencję podobną do szczepu PVY^N , kolejnych 696 nukleotydów jest podobne do NA- $PVY^{N:NTN}$, natomiast pozostała część

genomu stanowi element zaczerpnięty z dywergentnego, obecnie jeszcze nie scharakteryzowanego genotypu, stanowiącego ogniwo pośrednie pomiędzy PVY^N i NA-PVY^{N/NTN} (Lorenzen i in., 2008). Jednakże nie wszystkie izolaty należące do grupy PVY^{NTN} powstały w drodze rekombinacji. Już w 2003 roku Nie i Singh opisali izolat Tu 660, który poddano analizie filogenetycznej. Potwierdziła ona, że izolat ten wywodzi się ze szczepu NA-PVY^N i powstał na drodze mutacji, a nie rekombinacji genomowych (Nie i Singh, 2003b), potwierdzają to również badania przeprowadzone w Japonii. Większość tamtejszych izolatów PVY^{NTN} nie powstała w drodze rekombinacji (Ogawa i in., 2008). Kilka lat temu w Syrii opisano ciekawy izolat PVY, wstępnie zaklasyfikowano go do PVY^{NW}, ale po wykonaniu testów biologicznych, serologicznych i molekularnych wykazywał on właściwości pośrednie pomiędzy PVY^{NW}, a PVY^{NTN}, stąd nazwano go PVY^{SYR} (Chikh i in., 2007b). W 2010 r. również w Syrii opisano izolaty, które za pomocą testów serologicznych określono, jako szczep PVY^O (Chikh i in., 2010). Jednakże izolaty te, użyte do zakażenia tytoniu, wywoływały nekrozy nerwów, co sugerowałoby, że jest to typ PVY^{NW}. Po przeprowadzeniu dodatkowych testów biologicznych, okazało się, że część z nich wywołuje nekrozy na bulwach ziemniaków, co jest charakterystyczne dla PVY^{NTN}. Z tego też powodu wydzielono nową grupę w obrębie szczepu PVY^N i nazwano ją PVY^{NTN-NW}.

Celem określenia determinantów odpowiedzialnych za wywoływanie nekroz na tytoniu przebadano 3 izolaty PVY, fenotypowo 2 z nich należały do szczepu nekrotycznego PVY^N (PVY^{N-Wi} oraz PVY^{N-Ny}), a jeden – PVY^{O-LW} do szczepu zwykłego. Aby scharakteryzować te izolaty zsekwencjonowano gen CP, a otrzymane sekwencje porównywano z sekwencjami dostępnymi w bazach danych (Chachulska i in., 1997a). Izolat PVY^{NWi} wykazywał 99% homologię sekwencji w stosunku do izolatu PVY^{O-LW} i znacząco różnił się od nekrotycznego szczepu PVY^{N-Ny}. Przeprowadzona analiza filogenetyczna pozwoliła na zaklasyfikowanie izolatu PVY^{N-Ny} do I grupy obejmującej tylko szczepy nekrotyczne, do II – niejednorodnej grupy wszedł izolat PVY^{NWi} oraz PVY^{O-LW} (Chachulska i in., 1997a). Przeprowadzona analiza porównawcza dostępnych sekwencji izolatów wywołujących i nie wywołujących nekroz, pozwoliła na postawienie hipotezy, że determinanty nekroz nerwów tytoniu zlokalizowane są w rejonie końca 3' genomu wirusa i mogą obejmować gen CP oraz 3'NTR (Chachulska i in., 1997a). Zróznicowanie sekwencji genu CP jest szczególnie duże w N-końcu białka CP. Bazując na heterogeniczności N-końca białka CP, badane izolaty można było podzielić na 2 grupy. Do pierwszej należały izolaty gdzie pierwszym aminokwasem białka CP była glicyna (G), natomiast do drugiej grupy należały izolaty, u których pierwszym aminokwasem była alanina (A). Wewnętrzna

sekwencja genu CP pierwszej grupy izolatów wykazywała dużą homologię w odróżnieniu od drugiej grupy izolatów.

Analiza filogenetyczna oparta na sekwencji aminokwasów wchodzących w skład białka CP pozwoliła na wyodrębnienie 3 grup izolatów. Podobny układ – 3 grup osiągnięto po analizie filogenetycznej opartej na sekwencji nukleotydowej regionu 5'NTR i P1 (Tordo i in., 1995). Grupę I badanych izolatów stanowiły izolaty należące do PVY^N, zaś II grupę – izolaty zaliczane do PVY^O. Przeprowadzona analiza sekwencji regionu 3'NTR wykazała, że izolat PVY^NNy wykazywał dużą homologię z I grupą izolatów ustanowioną przy analizie białka płaszczka (CP). Izolaty PVY^NWi i PVY^O-LW wykazywały bardzo dużą homologię dochodzącą do 100% z izolatami z grupy II. Było to zaskoczeniem, szczególnie w odniesieniu do izolatu PVY^NWi, który zakwalifikowano jako nekrotyczny. I grupa izolatów była zdolna wywoływać nekrozy nerwów liści tytoniu oraz powodować nekrozy bulw ziemniaka. Izolaty należące do II grupy zarówno zwykłe jak i nekrotyczne nie były w stanie wywołać nekroz na bulwach ziemniaka. Izolaty należące do III grupy pochodziły z różnych rejonów świata i pozyskane były z różnych gatunków z rodziny *Solanaceae* i podobnie jak izolaty z II grupy nie powodowały nekroz na bulwach ziemniaka. Ścisła analiza sekwencji aminokwasowej białka CP wykazała, że izolaty należące do I grupy posiadały charakterystyczny motyw GSTKKDAKQ w pozycjach 9-17 i PNLNKEKE w pozycjach 24-31. Te charakterystyczne sekwencje nie zostały odnalezione wśród izolatów z pozostałych grup. Uznano, że te 2 rejony mogą stanowić epitopy charakterystyczne dla izolatów nekrotycznych. Ponieważ sekwencja aminokwasowa białka CP u izolatów PVY^O-LW oraz PVY^NWi była zbieżna w 99%, stwierdzono, że białko to, nie odpowiada za wywoływanie nekroz na tytoniu (Chachulska i in., 1997a).

Podobne badania prowadzono we Francji, gdzie amplifikowano cały genom wirusa w dwóch fragmentach i wykorzystywano metodę PCR-RFLP. Stwierdzono, że sekwencje odpowiedzialne za powstawanie nekroz na tytoniu zlokalizowane są raczej w części 5' genomu wirusa, podczas gdy w drugiej połowie genomu znajdują się sekwencje odpowiedzialne za powstawanie nekroz na bulwach ziemniaka (Glais i in., 1998). W dalszych badaniach doprecyzowano, że białkiem odpowiedzialnym za powstawanie nekroz nerwów liści tytoniu jest HC-Pro, a dokładniej obecność dwóch aminokwasów w C-końcowej jego części: K₄₀₀ oraz E₄₁₉, którym odpowiadają odpowiednio zmiany w sekwencji nukleotydowej genomu – A/G w pozycji 2213 oraz A/C w pozycji 2271 (Tribodet i in., 2005; Rolland i in., 2009). W 2009 roku wykazano, że substytucja aminokwasu D₂₀₅ na G₂₀₅ w centralnej części białka HC-Pro również wpływa na upośledzenie zdolności wywoływania nekroz nerwów liści

tytoniu (Hu i in., 2009). Określono również, że substytucje w obrębie jedenastu aminokwasów w centralnej części białka VPg odpowiadają za przełamywanie odporności warunkowanej genem *pvr2* w papryce (Ayme i in., 2007). Za powstawanie nekroz na bulwach ziemniaka odpowiadają natomiast białka NIa i NIb (Glais i in., 2002).

Podsumowując, obecna klasyfikacja PVY wyróżnia 5 szczepów: PVY^N, PVY^O, PVY^C, PVY^Z i PVY^E (Singh i in., 2008).

PVY^O (*ang. ordinary*), określane też szczepem zwykłym, powoduje nie nekrotyczne objawy mozaikowe na tytoniu oraz skręcanie i opadanie liści, a niekiedy nekrozy na ziemniaku (Chrzanowska, 1994).

PVY^C na tytoniu wywołuje podobne objawy do tych powodowanych przez PVY^O, podczas gdy na ziemniaku posiadającym gen *Nc* powoduje powstawanie chropowatych smug (De Bokx i in., 1981; Tordo i in., 1995).

PVY^N został podzielony na 2 grupy: PVY^{NW} określane również jako PVY^{N:O} – wywołujący nekrozy na liściach tytoniu oraz PVY^{NTN} – powodujący powstawanie nekroz na liściach tytoniu oraz dodatkowo wywołujący chorobę nekrotycznej pierścieniowej plamistości bulw ziemniaka (*ang. potato tuber ringspot necrotic disease PTNRD*) (Le Romancer & Kerlan, 1991). Warto dodać, że w ostatnim czasie zidentyfikowano też izolat wirusa z grupy PVY^{NW} zdolny wywoływać nekrozy na bulwach ziemniaka (Piche i in., 2004).

PVY^Z nie wywołuje nekroz na tytoniu i różni się od szczepów PVY^N, PVY^O i PVY^C, co zostało potwierdzone na podstawie nekrotycznych reakcji na różnicujących odmianach ziemniaków.

PVY^E pojawił się w Hiszpanii. Wykazuje podobieństwo wzorów restrykcyjnych do szczepu PVY^N, ale wykrywany jest przez przeciwciała skierowane przeciwko PVY^O i jednocześnie nie wywołuje nekroz na tytoniu. Na ziemniakach szczep ten przełamuje odporność warunkowaną przez geny *Ny*, *Nc* i *Nz* (Singh i in., 2008).

2.3. Mechanizmy ewolucji wirusowego RNA

Wysoką zmienność wirusy RNA zawdzięczają w dużej mierze wysokiemu współczynnikowi błędu polimerazy RNA zależnej od RNA. Prowadzi to do powstawania mutacji punktowych – substytucji i małych insercji lub delecji (Ramirez i in., 1994). Polimerazy RNA mają skłonność do popełniania błędów z uwagi na niską wierność replikacji oraz wskutek braku aktywności naprawczej (Ramirez i in., 1994). Stąd skłonność do popełniania błędów w stosunku do polimeraz DNA jest większa 10⁶ razy (Gillespie, 1993).

Kolejnym zjawiskiem wpływającym na różnorodność wirusów RNA jest rekombinacja RNA-RNA (Lai, 1992). Rekombinacje mogą eliminować mutacje nagromadzone podczas replikacji RNA (Lai 1992). Liczbę naturalnie pojawiających się rekombinantów szacuje się na ok. 8-17 % badanej populacji (Revers i in., 1996; Aranda i in., 1997). Rekombinacje występują zarówno pomiędzy różnymi izolatami wirusa, jak również pomiędzy wirusem, a materiałem genetycznym gospodarza. Stąd między innymi obecność ludzkiego 28S rRNA w genomie wirusa grypy (Khatchikian i in., 1991).

2.4. Źródła odporności tytoniu na PVY i zdolność ich przełamania przez nowe izolaty

Pojawienie się nekrotycznych dla tytoniu form PVY spowodowało podjęcie prac ukierunkowanych na poszukiwanie źródeł odporności. W niemieckim Forchheim w wyniku naświetlania promieniami Röntgena podatnej odmiany Virginia A, uzyskano rośliny odporne na PVY, które nazwano TI 1406 (ang. tobacco introduction) (Koelle, 1961) lub „Virgin A Mutant (VAM)” (Gupton i Burk, 1973) lub „Virgin Mutant” (Sievert, 1972). Dalsze badania dowiodły, że czynnikiem warunkującym ową odporność jest pojedynczy recesywny gen *va* zlokalizowany na chromosomie E (Gupton i Burk, 1973). Zastosowanie izolatów PVY o różnym stopniu zjadliwości pozwoliło na określenie jego trzech form allelicznych: *va*⁰, *va*¹, *va*². Gen ten został wprowadzony do różnych odmian tytoniu za pomocą tradycyjnej hodowli – TN86 (Athow i in., 1987) lub poprzez regenerację podwojonych haploidów w warunkach *in vitro* – NC744, NC745 (Burk in., 1979; Chaplin i in., 1980). Gen *va* odpowiada, za odporność nie tylko na wirusa Y ziemniaka (PVY), ale również na inne potywirusy: TVMV (ang. *Tobacco vein mottling*) i TEV (ang. *Tobacco etch virus*) (Nicolas i in., 1997).

Odpowiedzią na pojawienie się nekrotycznego szczepu PVY w Polsce w latach 1956 - 1960 było podjęcie badań nad pozyskaniem form odpornych. W efekcie prac hodowlanych poprzez krzyżowanie z różnymi odmianami, również w typie orientalnym, uzyskano odmiany odporne. Jednakże źródło odporności tych odmian nie jest całkowicie zdefiniowane. Odporność polskich odmian warunkowana jest pojedynczym recesywnym genem, co może świadczyć iż mechanizm odporności może również polegać na delecji genu warunkującego podatność na PVY, podobnie jak u odmiany VAM (Doroszevska, 2004). Podobnie francuska odmiana PBD6 wykorzystana w badaniach autora niniejszej rozprawy ma swój rodowód pochodzący od odmiany paragwajskiej (Verrier, 2001b), a jej mechanizm odporności jest warunkowany delecją locus odpowiedzialnego za podatność na PVY. Znane są również linie hodowlane (NC 602) posiadające odporność na PVY dzięki częściowo dominującemu genowi VR. Odporność warunkowana tym genem jest jednak efektywna tylko do mało zjadliwych

nienekrotycznych izolatów PVY (Witherspoon i in., 1991). Innym źródłem genów odporności na PVY są dzikie gatunki rodzaju *Nicotiana*. Wykazano, że 4 gatunki: *N. raimondii*, *N. knightiana*, *N. glauca* i *N. africana* są całkowicie odporne na PVY, zaś gatunki *N. benavidesii*, *N. wigandioides* i *N. noctiflora* wykazywały wysoki poziom odporności na wiele izolatów tego patogena (Doroszevska i Depta, 2011). Niektóre gatunki wykorzystano do tworzenia nowych odmian tytoniu. W ten sposób powstała linia hodowlana BPA z cechą odporności pochodzącą od *N. africana* (Doroszevska, 2010). Prace nad przeniesieniem odporności na PVY prowadzono również z wykorzystaniem gatunku *N. benavidesii* do tytoniu uprawnego (Berbeć i Głażewska, 1988) oraz *N. raimondii* do tytoniu odmiany Zamojska 4 (Berbeć, 1988). Trudności z wykorzystaniem dzikich gatunków wynikają z szeregu problemów związanych ze skutecznym przeniesieniem czynników odporności i jednoczesnym zachowaniem wysokiej jakości tytoniu. Dlatego najczęściej stosowane w hodowli są źródła odporności istniejące w odmianach uprawnych. Niestety problem przełamania tych odporności pojawia się coraz częściej. Prowadzonych jest wiele badań nad wyjaśnieniem tego zjawiska.

Już w 1997 roku Nicolas stwierdził, że do przełamania odporności tytoniu przez TVMV, konieczne i jednocześnie wystarczające są mutacje: Cys₁₉₂₈, Ser₁₉₂₉, Lys₁₉₃₂, Ser₁₉₃₃, w genie kodującym białko VPg (Nicolas i in., 1997). Dwa lata później podobne badania nad PVY podjęto w Japonii. Badania prowadzono przy użyciu 18 japońskich izolatów wirusa. W wyniku wielokrotnych pasażów izolatów wirusa na odmianie VAM wyłoniono 2 spontanicznie powstałe mutanty PVY-36B i PVY-O_{HB} zdolne do przełamania odporności warunkowanej genem *va* (Masuta i in., 1999). W celu określenia tej mutacji zsekwencjonowano cały genom tych mutantów i porównano z sekwencjami oryginalnych izolatów: PVY-36 i PVY-O_H. Odnaleziono dwie mutacje, sugerujące, że mogą mieć one bezpośredni wpływ na przełamanie odporności odmiany VAM. Były to mutacja w pozycji 1948 i 2235 poliproteiny, odpowiednio w rejonie białka NIa-VPg i NIa-Pro. Aby wykluczyć ewentualny zbieg okoliczności, sekwencje rejonu białka NIa porównano z sekwencjami dwóch innych izolatów (PVY-YNA i PVY-Y7) przełamujących odporność VAM. Wszystkie izolaty zdolne przełamwać odporność w pozycji 1948 posiadały kwas glutaminowy, zaś nie przełamujące lizynę lub argininę. Mutacja w pozycji 2235 nie miała związku ze zdolnością przełamania odporności (Masuta i in., 1999).

						70
36	GKNKSKRIQA	LKFRHARDKR	AGFEIDNND	TIEEFFGSAY	RKKGKGGKTT	VGMGKSSRRF INMYGFDPTE
OH	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T13	-----	-----	-----	-----	-----	V-----
TJT	-----	-----	-----	-----	-----	V-----
36B	-----	-----	-----	-----	-----	-----
OHB	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Y7	-----	-----	-----	-----	-----	-----
YNA	-----	-----	-----	-----	-----	-----
			↓			
						140
36	YSFIQFVDPL	TGAQIEENVY	ADIRDIQERF	SEVRKKMVEN	DDIEMQALGS	NTTIHAYFRK DWSDKALKID
OH	-----	-----	-----	-----K-----	-----	-----
T13	-----	-----G-----	-----	-----D-R-DD-----	-----E-L-S-----	-----N-----V-
TJT	-----	-----G-----	-----	-----D-R-D-----	-----E-L-----	-----N-----
36B	-----	-----	-----	-----E-D-----	-----	-----
OHB	-----	-----	-----	-----G-E-----	-----	-----
Y7	-----	-----	-----V-----	-----E-----	-----E-----	-----
YNA	-----	-----	-----V-----	-----E-----	-----	-----
						188
36	LMPHNPLKVC	DKTNGIAKFP	ERELELRQTG	PAVEVDVKDI	PAQEVEHE	
OH	-----I-----	-----	-----	-----	-----T-----	
T13	-----I-----	-----S-----	-----F-----	-----I-----	-----K-----	
TJT	-----I-----	-----S-----	-----	-----I-----	-----K-----	
36B	-----	-----	-----	-----	-----X-----	
OHB	-----I-----	-----	-----	-----	-----T-----	
Y7	-----I-----	-----	-----F-----	-----	-----	
YNA	-----I-----	-----	-----F-----	-----	-----	

Rys. 5. Porównanie sekwencji aminokwasowej białka VPg ośmiu izolatów wirusa Y ziemniaka. Cztery izolaty (PVY-36B, PVY-O_{HB}, PVY-Y7, PVY-YNA) przełamują odporność tytoniu odmiany VAM. Strzałką oznaczono aminokwas odpowiedzialny za zdolność do przełamania odporności (Masuta i in., 1999)

W tym samym roku podjęto badania nad wyjaśnieniem mechanizmu odporności odmiany VAM przy użyciu markerów RAPD. Do badań użyto linii izogenicznych, różniących się jedynie odpornością na PVY. Wytypowano 10 markerów wykazujących asocjację z cechą podatności na PVY. Nie stwierdzono ich występowania w przypadku roślin odpornych. Na tej podstawie stwierdzono, że odporność warunkowana przez *va* spowodowana jest delecją dużego fragmentu genomu (powyżej 1Mb) niosącego dominujący allel *Va*, warunkujący podatność na PVY (Noguchi i in., 1999).

Kilka lat później w USA przeprowadzono ciekawe badania dotyczące przełamania odporności przez izolaty PVY. Do badań wykorzystano odmiany VAM i NC745 – obie niosące gen odporności *va*. Mimo to, odmiana VAM nigdy nie ulegała porażeniu, natomiast na odmianie NC 745 niekiedy pojawiały się objawy systemiczne. Badania wykazały, że odmiana VAM niesie nie jeden, lecz 2 recesywne geny odporności na PVY – dotychczas znany *va*, który odpowiedzialny jest za przemieszczanie się wirusa z komórki do komórki

oraz drugi – nowo poznany recesywny gen *va2*, który odpowiada za nagromadzenie się wirusa w zainfekowanej komórce (Acosta-Leal i Xiong, 2008).

Zauważono też, że potywirusowe białko VPg oddziałuje *in vivo* z eukariotycznym czynnikiem inicjacji translacji – eIF4E (Wittmann i in., 1997). Obecnie znanych jest już kilka genów odporności kodujących izoformy tego czynnika (eIF4E) (Acosta-Leal i Xiong, 2008). Dodatkowo stwierdzono, że izolaty wirusa zdolne przełamywać odporność zawierają mutację, albo w obrębie genu VPg (Kang i in., 2005), albo w rejonie nie podlegającym translacji u wirusów nie kodujących białka VPg (Nieto i in., 2006; Yoshii i in., 2004). Co więcej, zakłócenie w oddziaływaniu VPg-eIF4E, może być połączone z fenotypem odpornym (Ruffel i in., 2006; Yeam i in., 2007). W ten sposób kompatybilne izoformy czynnika eIF4E prawdopodobnie wymagane są przez wirusy do ich translacji, replikacji oraz transportu międzykomórkowego (Robaglia i Caranta, 2006). Chociaż produkt genu *va* nie został do końca poznany, to przypuszcza się, że gen ten może kodować wadliwy czynnik eIF4E (Acosta-Leal i Xiong, 2008).

3. Materiały i metody

3.1. Materiał roślinny

Do badań użyto 10 odmian tytoniu: 5 odmian podatnych na PVY i 5 odmian uznanych za odporne. Zastosowano ten sam zestaw odmian, który wykorzystywany jest w międzynarodowych badaniach nad występowaniem i charakterystyką PVY koordynowanym przez T. Doroszewską w ramach programu Virus Diseases Collaborative Study, CORESTA.

Odmiany podatne:

- NC 95 – odmiana w typie papierosowym jasnym, suszona ogniowo, powstała ze skrzyżowania linii (C-139 x Bel.4-30) x (C-139 x Hicks). Posiada gen Rk zapewniający odporność na nicienia *Meloidogyne incognita*. Odporność na nicienie skorelowana jest z wysoką podatnością na szczep MN wirusa Y ziemniaka (rozdz. 2.2.).
- K326 – odmiana w typie papierosowym jasnym, suszona ogniowo, powstała ze skrzyżowania odmiany McNair 225 x (McNair 30 x NC 95). Odmiana ta jest znana z wysokiej jakości surowca i jest jedną z częściej uprawianych odmian na świecie.
- Habana 92 – odmiana tytoniu ciemnego, suszonego powietrznie pochodzącego z Kuby.
- Burley 21 – odmiana w typie papierosowym jasnym Burley, suszona powietrznie. Podatna na większość izolatów PVY, ale wykazuje odporność na niektóre północno-amerykańskie izolaty wirusa. Badania nad tą odmianą dowiodły, że odporność na PVY warunkowana jest tu przez dwa dominujące geny, podczas gdy u odpornej odmiany VAM warunkowana jest pojedynczym recesywnym genem (Arcia-Montezuma, 1979). Odmiana odporna na TMV.
- Kentucky 17 – odmiana w typie papierosowym jasnym Burley, suszona powietrznie, podatna na PVY. Po infekcji wykazuje bardzo szybko silne objawy chorobowe.

Odmiany odporne

- Virgin A Mutant (VAM) – odmiana niemiecka typu Virginia, uzyskana przez naświetlanie promieniami Röntgena nasion tytoniu odmiany Virgin A (Koelle, 1961). Odmiana VAM wykazuje odporność na TVMV, TEV i PVY. Odporność na patogeny zawdzięcza dużej delecji w locus Va (Noguchi i in., 1999). Odmiana VAM jest

jednocześnie wysoce podatna na mączniaka rzekomego powodowanego przez *Peronospora tabacina*.

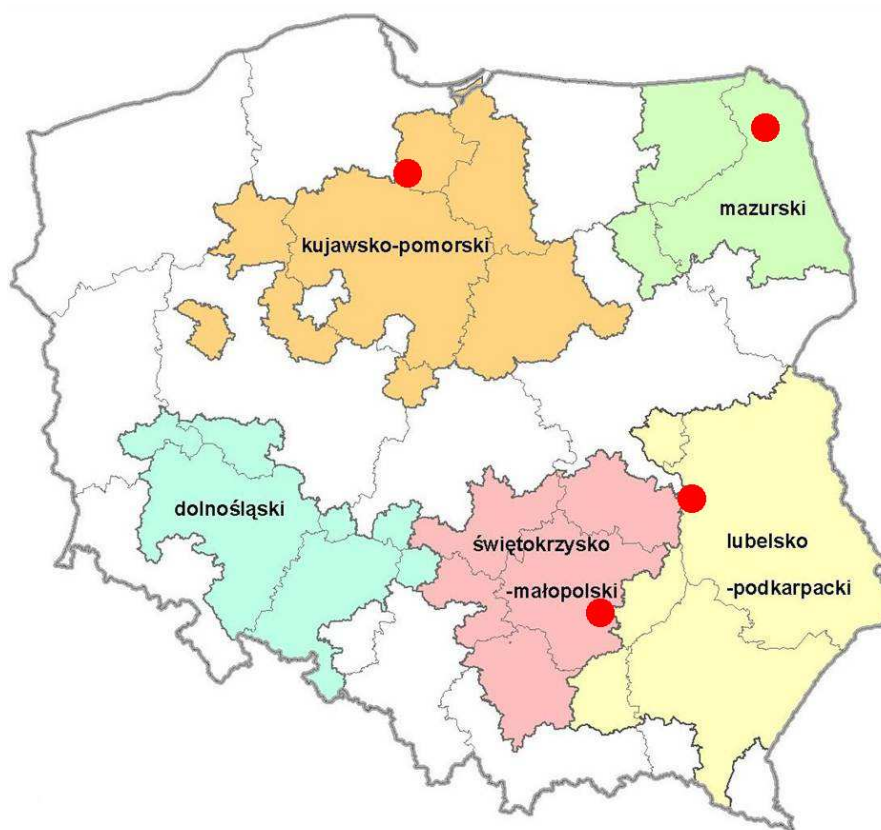
- Wiślica – polska odmiana typu papierosowego jasnego, suszona ogniowo, wykazująca wysoką odporność na PVY. Pochodzenie źródła odporności nie jest dokładnie określone. Można przypuszczać, że odporność tej odmiany podobnie jak większości polskich odmian wywodzi się od odmian orientalnych, będących w przeszłości materiałem wyjściowym w hodowli odpornościowej. Jednakże odporność ta warunkowana pojedynczym recesywnym genem, świadczy o podobnym mechanizmie do opisanego u odmiany VAM, polegającym na delecji genu warunkującego podatność i może być wynikiem mutacji i selekcji.
- Virginia SCR (VD) – odmiana typu papierosowego jasnego, suszona ogniowo, będąca główną odmianą uprawianą w Niemczech i Francji w latach osiemdziesiątych XX wieku. Uzyskana w wyniku masowej selekcji z odmiany VN1 (Carsten i Seehofer, 1960). Wykazuje odporność na większość izolatów PVY. Odporność ta warunkowana jest podobnie jak u VAM allelem recesywnym, powstałym w wyniku delecji fragmentu locus Va, z tym że tutaj delecji uległ inny fragment genu Va (Noguchi i in., 1999). Może to tłumaczyć zjawisko częstszego porażania odmiany Virginia SCR niż VAM.
- PBD 6 – odmiana typu papierosowego ciemnego, suszona powietrznie. Uzyskana w wyniku krzyżowania odmiany Paraguay P48 x Bel 61-10. Przypuszczano, że odporność na PVY mogła pochodzić od odmiany Paraguay P48, która była szeroko uprawianą odmianą tytoniu ciemnego we Francji w latach siedemdziesiątych XX wieku, bądź powstała w wyniku mutacji i kierunkowej selekcji.
- TN 86 – odmiana typu papierosowego jasnego Burley, suszona powietrznie, z cechą odporności na PVY przeniesioną z odmiany VAM. Podobnie jak VAM jest wysoce odporna na TVMV, TEV i PVY.

3.2. Doświadczenia polowe

Doświadczenia prowadzone były w 4 lokalizacjach znajdujących się w głównych rejonach uprawy tytoniu w Polsce: lubelsko-podkarpackim (RZD IUNG-PIB „Kępa” – Puławy) – GPS 51.402128, 21.956152 (+51° 24' 7.66", +21° 57' 22.15"), świętokrzysko-małopolskim (Skroniów k. Jędrzejowa) – GPS 50.629328, 20.272214 (+50° 37' 45.58", +20° 16' 19.97"), kujawsko-pomorskim (Stare Marzy k. Grudziądz) – GPS 53.474526, 18.659749

(+53° 28' 28.29", +18° 39' 35.10"), mazurskim (Chmielniki k. Augustowa) – GPS 53.656150, 23.111186 (+53° 39' 22.14", +23° 6' 40.27") (rys. 6).

Produkcję rozsady prowadzono w paletach wielokomorowych. Sadzenie rozsady na polu doświadczalnym wykonywano w I połowie maja, a ewentualnie brakujące rośliny uzupełniano w okresie 2 tygodni od wysadzenia. Doświadczenia prowadzone były metodą bloków kompletnie zrandomizowanych w 4 powtórzeniach, po 32 rośliny na poletku, co ogółem dawało po 128 roślin każdej z odmian. Obserwacje na polach doświadczalnych wykonywano w Puławach 4-krotnie, w pozostałych lokalizacjach 2-krotnie. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie, przy zastosowaniu analizy wariancji szacując istotność różnic na poziomie $\alpha = 0,05$ (test Tukeya).



Rys. 6. Lokalizacja doświadczeń polowych w głównych rejonach uprawy tytoniu w Polsce

3.3. Izolaty wirusa

Próbki liści tytoniu pobierano z poszczególnych roślin tytoniu wykazujących objawy infekcji wirusem Y ziemniaka – zarówno z roślin odmian podatnych jak i odpornych. Wprowadzono następujące nazwy kodowe: izolat oznaczony jako 3.K326/A/07, 3 –

oznaczenie kolejnego numeru próbki pobranej w danej lokalizacji w danym roku, K326 – nazwa odmiany, z której został pobrany izolat wirusa, A, G, J, P – lokalizacja doświadczenia polowego (odpowiednio: Augustów, Grudziądz, Jędrzejów, Puławy), 07 – rok pobrania próbki (w tym przypadku 2007). Ogółem zgromadzono 192 izolaty wirusa pochodzące z czterech lokalizacji w Polsce. Ponadto do analiz molekularnych dodatkowo wykorzystano 6 izolatów chorwackich i 13 izolatów niemieckich, pozyskanych odpowiednio z firmy Chorwacki Tytoń (Hrvatski Duhani) i z Centrum Techniki Rolniczej (Landwirtschaftlichen Technologiezentrum) w Augustenberg. Izolaty zagraniczne pozyskano w ramach międzynarodowych badań CORESTA koordynowanych przez prof. T. Doroszewską. Pełny wykaz badanych izolatów wraz z ich charakterystyką biologiczną i serologiczną zamieszczono w załączniku (Załącznik 1).

3.4. Badania biologiczne

3.4.1. Inokulacja

Zdolność przełamywania odporności odmian przez poszczególne izolaty, określano za pomocą testów biologicznych. Pobrane z pól doświadczalnych próbki były ucierane w moździerz, a otrzymany sok był wykorzystywany do inokulacji. Inokulację prowadzono na dobrze rosnących roślinach w fazie 5-6 liści. W badaniach uwzględniono: 2 rośliny odmiany Samsun H (szczególnie podatna na PVY, ale odporna na wirusa mozaiki tytoniowej – TMV), 2 rośliny odmiany Wiślica i 2 rośliny odmiany VAM (odmiany stanowiące główne źródła odporności na PVY).

3.4.2. Obserwacje objawów chorobowych

Sztucznie zakażane rośliny były przetrzymywane w szklarni zabezpieczonej przed działaniem owadów, w kontrolowanych warunkach temperatury (25°C w dzień i 20°C w nocy). Po 14 i 21 dniach od inokulacji dokonywano obserwacji objawów wirusa. Rośliny z widocznymi objawami nekrozy nerwów uznawane były za zainfekowane wirusem, natomiast z roślin nie wykazujących objawów nekrotycznych pobierano próbki liści celem serologicznego określenia poziomu wirusa w tkankach roślin.

3.5. Badania serologiczne

Aby określić przynależność poszczególnych izolatów wirusa do odpowiednich grup i szczepów prowadzono badania serologiczne. Objęto nimi próbki roślin pobrane z pól doświadczalnych w różnych rejonach Polski oraz próbki z roślin inokulowanych w szklarni.

Próbki ucierano w moździerz, następnie otrzymany sok był wykorzystywany do wykonania testów DAS-ELISA z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych. Do wykrywania wszystkich szczepów wirusa Y ziemniaka wykorzystano przeciwciała MoAbs anti Y, IgG 112911 szwajcarskiej firmy Bioreba. Do wykrywania szczepów nekrotycznych PVY wykorzystano przeciwciała MoAbs anti Y^N, IgG 112 712, również firmy Bioreba. Jako koniugatu użyto tych samych przeciwciał połączonych z fosfatazą alkaliczną. Jako substratu użyto pNPP (p-Nitro Phenyl Phosphate). Pomiar absorbancji przy długości fali 405nm był dokonywany na czytniku mikropłytek Tecan Sunrise™ po 30 i 45 minutach od naniesienia substratu. Kontrolę negatywną stanowiły rośliny niezakażane, pozytywną – rośliny z widocznymi objawami. Otrzymane wyniki absorbancji zostały poddane stosownym obliczeniom zgodnie z metodą zaproponowaną przez producenta przeciwciał. W pierwszej kolejności surowe dane były szeregowane od najmniejszej do największej wartości absorbancji. Następnie, na podstawie tego szeregu wartości wykresłany był histogram rozkładu wartości. W dalszej kolejności na podstawie histogramu wyznaczano tzw. „skok” wartości absorbancji ponad tło. Następnie ze wszystkich wartości mniejszych od „skoku” wyliczano średnią arytmetyczną. Dla tych wartości wyznaczano odchylenie standardowe (s), po czym na podstawie wzoru (poniżej) wyznaczano wartość, od której wartości absorbancji uznawano za pozytywne.

$$\text{wartość pozytywna} \geq \text{średnia} + 3s + 10\%$$

W całej niniejszej pracy zastosowano jednolity system kolorystyczny, oznaczania przynależności izolatów do odpowiednich serotypów. Izolaty PVY^NW oznaczone są kolorem zielonym, zaś izolaty PVY^{NTN} kolorem pomarańczowym.

3.6. Charakterystyka molekularna izolatów PVY

Celem badań molekularnych było określenie stopnia homologii genomów badanych izolatów wirusa, oraz po zsekwencjonowaniu genomów wybranych izolatów, określenie determinantów odpowiedzialnych za zdolność do przełamania odporności odmian uznanych za odporne.

3.6.1. Izolacja RNA

100 mg liści tytoniu umieszczano w moździerz wypełnionym ciekłym azotem i ucierano do konsystencji gładkiego proszku. Izolacje RNA prowadzono z wykorzystaniem zestawu RNeasy Plant mini Kit firmy Qiagen. W tym celu utarte liście przenoszono do

wcześniej schłodzonych próbek typu eppendorf. Dodawano 450 µl buforu RLT i poddawano worteksowaniu. Następnie dla lepszej homogenizacji inkubowano w 56°C przez 3 minuty. W dalszej kolejności lizat przenoszono na kolumnę QIAshredder Spin Column. Zawartość wirowano w temperaturze 20°C, przy 15.000 obr./min. przez 2 minuty. Po wirowaniu supernatant przenoszono do nowej próbki i dodawano do niej 0,5 objętości 96% etanolu i mieszano przez rozpipetowanie. Tak przygotowaną mieszaninę nanoszono na kolumnę RNeasy Spin Column i wirowano w temperaturze 20°C, przy 11.000 obr./min. przez 15 sekund. Supernatant odrzucano, a na kolumnę nanoszono 700 µl buforu RW1 i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Supernatant odrzucano, a na kolumnę nanoszono 500µl buforu RPE i wirowano w temperaturze 20°C przy 11.000 obr./min. przez 2 minuty. Supernatant odrzucano. Bezpośrednio na membranę kolumny nanoszono 30 ml sterylnej wody pozbawionej RN-az i wirowano przy 11.000 obr./min. przez 1 minutę, po czym dla zwiększenia stężenia RNA w próbce supernatant zawracano na kolumnę i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Następnie przy zastosowaniu fotometru przy długości fali 260 nm (BioPhotometer Eppendorf), określano zawartość RNA w supernatancie.

3.6.2. Odwrotna transkrypcja (RT-PCR)

Wyizolowany wirusowy RNA o pełnej długości poddawany był reakcji odwrotnej transkrypcji (RT-PCR). W tym celu do 2µg RNA dodawano 1µl oligonukleotydów (dT)₁₅ w stężeniu 500 µg/ml, 1 µl 10mM dNTP (Roche Diagnostics) i uzupełniano do objętości 12 µl sterylną, pozbawioną RN-az wodą. Mieszaninę ogrzewano do 65°C przez 5 minut, po czym szybko chłodzono w lodzie. Następnie dodawano 4 µl buforu 5x First Strand Buffer, 2 µl 0,1M DTT (Invitrogen Corp.) oraz 1 µl (40 u/µl) inhibitora rybonukleaz (Fermentas) i inkubowano przez 2 minuty w 42°C. Następnie dodawano 1 µl (200 units) odwrotnej transkryptazy Superscript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen Corp.). Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono w 42°C przez 50 minut. Następnie mieszaninę ogrzewano w 70°C przez 15 minut celem inaktywacji enzymu. Odwrotną transkrypcję prowadzono przy użyciu termocyklera Biometra TPersonal.

3.6.3. Amplifikacja DNA (PCR)

Do reakcji PCR zastosowano polimerazę Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics) oraz użyto specyficznych starterów dobranych w ten sposób aby produkt reakcji amplifikacji obejmował całą długość genomu wirusa: PVY-1S 5'GTCTCCTGATTGAAGTTTACAG 3' i PVY-2S 5'GAAATTAACAACACTCAATAC

AAC 3'. 1 μ l 10-krotnie rozcieńczonego cDNA pełnej długości otrzymanego w reakcji odwrotnej transkrypcji używano jako matrycy, następnie dodawano 1,75 μ l 10mM dNTP (Roche Diagnostics), 0,4 μ M każdego ze starterów, 5 μ l buforu 3 i 0,75 μ l polimerazy. Reakcję prowadzono w końcowej objętości 50 μ l. Amplifikację rozpoczynano od wstępnej denaturacji w 94°C przez 2 minuty, następnie prowadzono 10 cykli: denaturacja 94°C przez 10 sekund, annealing 55°C przez 30 sekund, elongacja 68°C przez 8 minut. Następnie prowadzono 22 cykle: denaturacja 94°C przez 10 sekund, annealing 55°C przez 30 sekund, elongacja 68°C przez 8 minut wydłużana o 15 sekund w każdym następnym cyklu i końcowa elongacja w 68°C trwająca 5 minut. Amplifikację DNA przeprowadzono przy użyciu termocyklera Biometra TPersonal.

3.6.4. Elektroforeza produktów reakcji PCR i elucja DNA wirusa

Elektroforezę produktów PCR prowadzono na 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny w buforze TBE (90mM Tris-boran, 2mM EDTA, pH 8,3) przy 5V/cm. Jako standardu wielkości używano markera 1kb GeneRuler firmy Fermentas. Wizualizacja prążków DNA następowała w świetle UV przy długości fali 312nm. Do dokumentacji żeli agarozowych stosowano system Infinty firmy Vilber Lourmat. Do 10 μ l próbki DNA po PCR, dodawano 2 μ l 6x stężonego barwnika do elektroforezy (0,25% cyjanolksylenu, 0,25% błękitu bromofenolu, 30% glicerolu). Powstałe podczas amplifikacji DNA niespecyficzne produkty były rozdzielane podczas elektroforezy i tylko fragment żelu z prążkiem zawierającym wirusa Y ziemniaka był wycinany, ważony, a następnie DNA było z niego eluowane przy użyciu zestawu GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich). W tym celu do wyciętego fragmentu żelu dodawano 3 objętości roztworu rozpuszczającego żel i inkubowano w temperaturze 60°C przez 10 minut, krótko wortexując co 2 minuty. W międzyczasie kondycjonowano kolumnę poprzez naniesienie na nią 500 μ l roztworu Column Preparation Solution i 1-minutowe wirowanie przy 12.000 obr./min. Do rozpuszczonego żelu dodawano 1 objętość izopropanolu i wortexowano, a następnie nanoszono na skondycjonowaną kolumnę i wirowano przy 12.000 obr./min. przez 1 minutę. Supernatant odrzucano, a na kolumnę nanoszono 700 μ l roztworu płuczącego i wirowano w tych samych warunkach. Supernatant odrzucano, a na kolumnę nanoszono 30 μ l roztworu do elucji DNA.

3.6.5. Trawienie produktów amplifikacji DNA enzymami restrykcyjnymi (RFLP)

Wyeluowany DNA wirusowy poddawano trawieniu 3 enzymami restrykcyjnymi: Hinf I, Hin6 I oraz Sdu I (Fermentas). Endonukleazy użyte do trawienia DNA dobrano tak,

aby rozpoznawane przez nie miejsca restrykcyjne w opublikowanej sekwencji genomu PVY^N-Fr (NC_001616) występowały w znacznej ilości. W skład mieszaniny do restrykcji wchodziło 30 µl wyeluowanego DNA poddawanego trawieniu, 30 jednostek (units) endonukleazy i 4 µl 10x stężonego buforu odpowiedniego dla poszczególnych restryktaz. Trawienie prowadzono w 37°C przez 16 godzin.

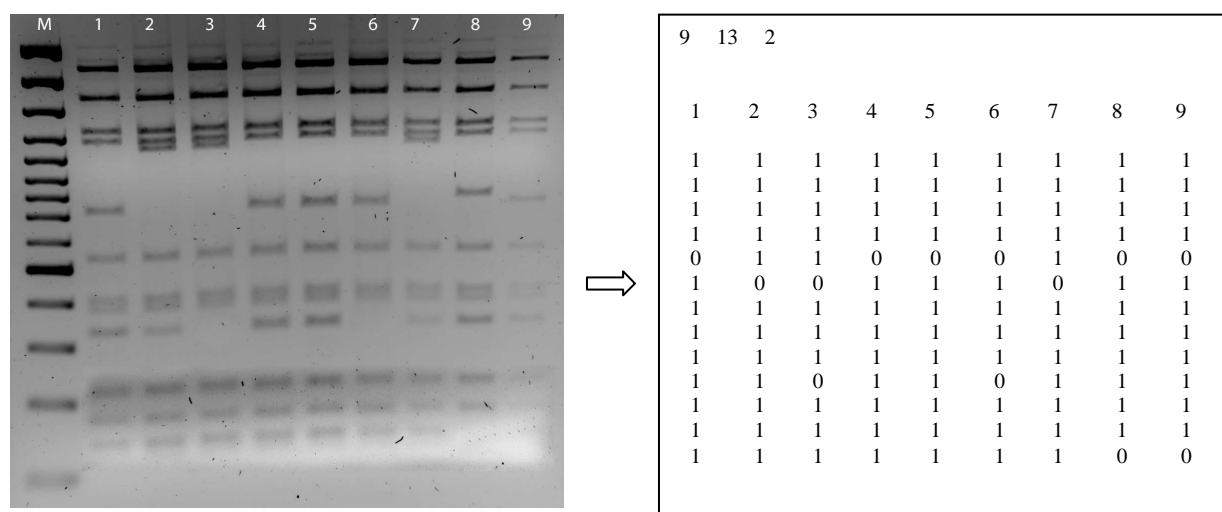
3.6.6. Elektroforeza produktów trawienia DNA

Powstałe produkty trawienia (RFLP) były rozdzielane podczas elektroforezy na 2% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny w buforze TBE (90mM Tris-boran, 2mM EDTA, pH 8,3) przy 5V/cm. Wizualizacja prążków DNA następowała w świetle UV przy długości fali 312nm. Do dokumentacji żeli agarozowych stosowano system Infinty firmy Vilber Lourmat. Do 10µl mieszaniny DNA po trawieniu dodawano 2µl 6x stężonego barwnika do elektroforezy (0,25% cyjanolksylenu, 0,25% błętku bromofenolu, 30% glicerolu). Jako standardu wielkości używano markera 100b GeneRuler firmy Fermentas. Wizualizacja prążków DNA następowała w świetle UV przy długości fali 312nm.

3.7. Analiza filogenetyczna

3.7.1. Analiza wzorów RFLP

Żele po elektroforezie produktów RFLP były fotografowane i archiwizowane. Analiza filogenetyczna była oparta na analizie obecności lub braku odpowiednich fragmentów restrykcyjnych. Przykład interpretacji wzorów restrykcyjnych przedstawiono na rysunku 7.



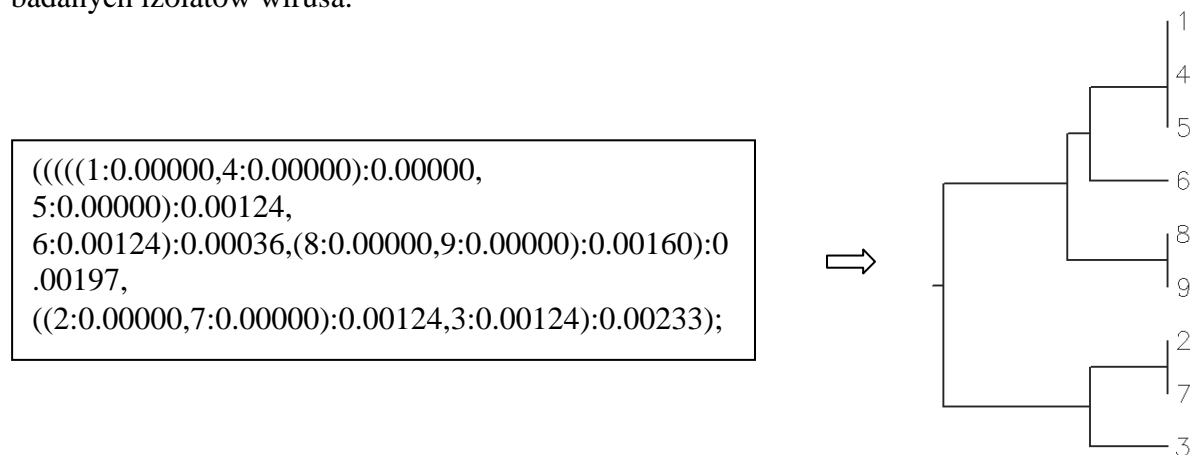
Rys. 7. Przygotowanie pliku wsadowego do programu RESTDIST na podstawie wzorów restrykcyjnych

Przygotowane odpowiednie pliki wsadowe, importowano do programu RESTDIST pakietu PHYLIP ver.3.63 (Felsenstein, 2004), w którym obliczono odległości genetyczne pomiędzy izolatami (rys. 8).

1	0.000000	0.004889	0.007897	0.000000	0.000000	0.002485	0.004889	0.002485	0.002485
2	0.004889	0.000000	0.002485	0.004889	0.004889	0.007897	0.000000	0.007897	0.007897
3	0.007897	0.002485	0.000000	0.007897	0.007897	0.005361	0.002485	0.011422	0.011422
4	0.000000	0.004889	0.007897	0.000000	0.000000	0.002485	0.004889	0.002485	0.002485
5	0.000000	0.004889	0.007897	0.000000	0.000000	0.002485	0.004889	0.002485	0.002485
6	0.002485	0.007897	0.005361	0.002485	0.002485	0.000000	0.007897	0.005361	0.005361
7	0.004889	0.000000	0.002485	0.004889	0.004889	0.007897	0.000000	0.007897	0.007897
8	0.002485	0.007897	0.011422	0.002485	0.002485	0.005361	0.007897	0.000000	0.000000
9	0.002485	0.007897	0.011422	0.002485	0.002485	0.005361	0.007897	0.000000	0.000000

Rys. 8. Macierz dystansów genetycznych między izolatami

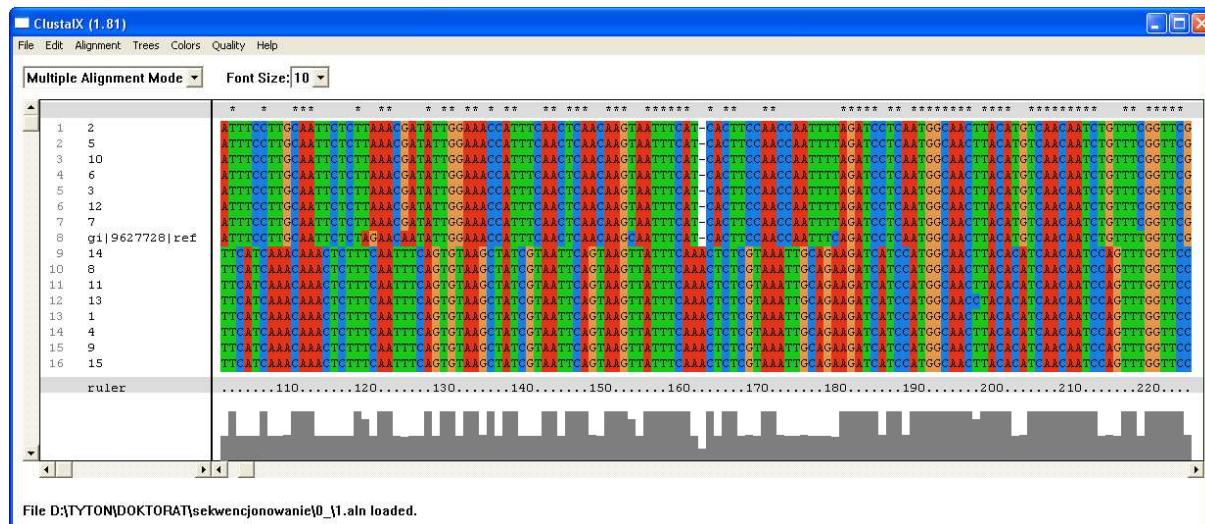
Uzyskaną w programie RESTDIST macierz odległości genetycznych, importowano do programu NEIGHBOR, w którym konstruowano filogenetyczne drzewo pokrewieństw przy zastosowaniu algorytmu UPGMA oraz Neighbour-Joining (rys. 9). Wizualizacja drzew filogenetycznych została wykonana za pomocą programu DRAWGRAM. Na podstawie topologii drzew filogenetycznych oceniano zdolność użytych restryktaz do różnicowania badanych izolatów wirusa.



Rys.9. Przykład filogenetycznego drzewa pokrewieństw w formie liczbowej (z lewej) i graficznej (z prawej)

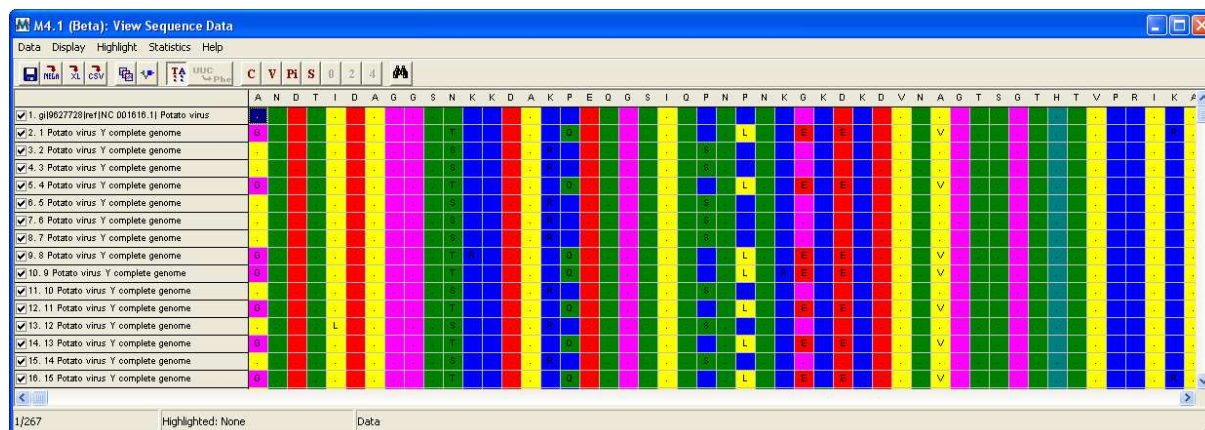
3.7.2. Sekwencjonowanie genomu wirusa

Matryca w postaci cDNA pełnej długości została wykonana w IUNG-PIB, natomiast właściwe sekwencjonowanie zostało wykonane w firmie Genomed. Otrzymane sekwencje zostały wyrównane za pomocą programu ClustalX (Thompson i in., 1997) (rys.10).



Rys. 10. Wyrównane sekwencje wirusa

Następnie wyodrębnione zostały sekwencje kodujące poszczególne białka i na ich podstawie w programie MEGA 4.1 (Tamura i in., 2007, Kumar i in., 2008) wydedukowano sekwencję aminokwasową poszczególnych białek (rys. 11). Na podstawie różnic w sekwencji aminokwasowej białek izolatów zdolnych i niezdolnych do przełamania odporności tytoniu określone zostały determinanty odpowiedzialne za ten proces.



Rys. 11. Sekwencje aminokwasowe wydedukowane za pomocą programu MEGA 4.1, na podstawie sekwencji nukleotydowych izolatów wirusa

3.7.3. Detekcja zdarzeń rekombinacyjnych

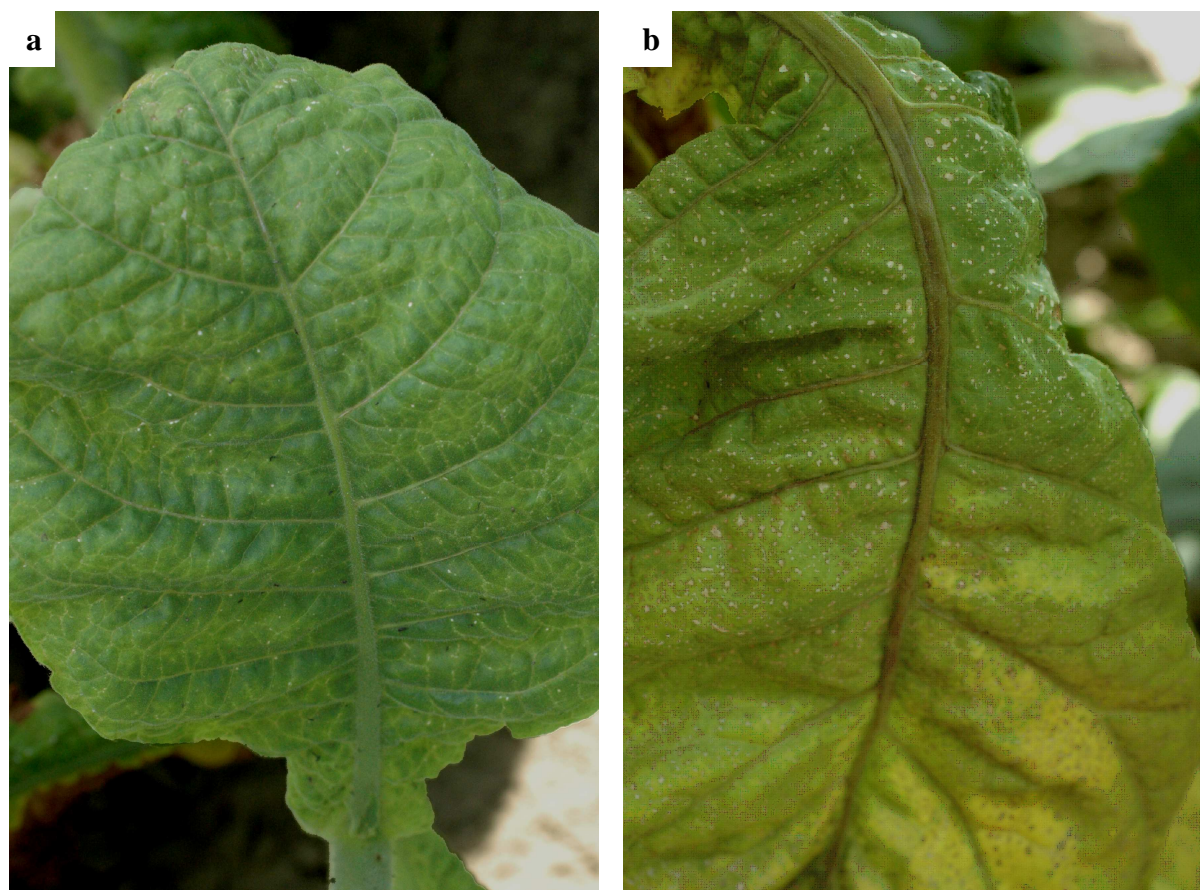
Do wykrywania zdarzeń rekombinacyjnych w genomie wirusa Y ziemniaka zastosowano pakiet RDP ver. 3.34. W tym celu jako pliki wsadowe użyto wyrównane sekwencje 15 izolatów PVY. Przeprowadzono 5 niezależnych analiz detekcji zdarzeń rekombinacyjnych, które następnie przedstawiono w formie graficznej. W tym celu

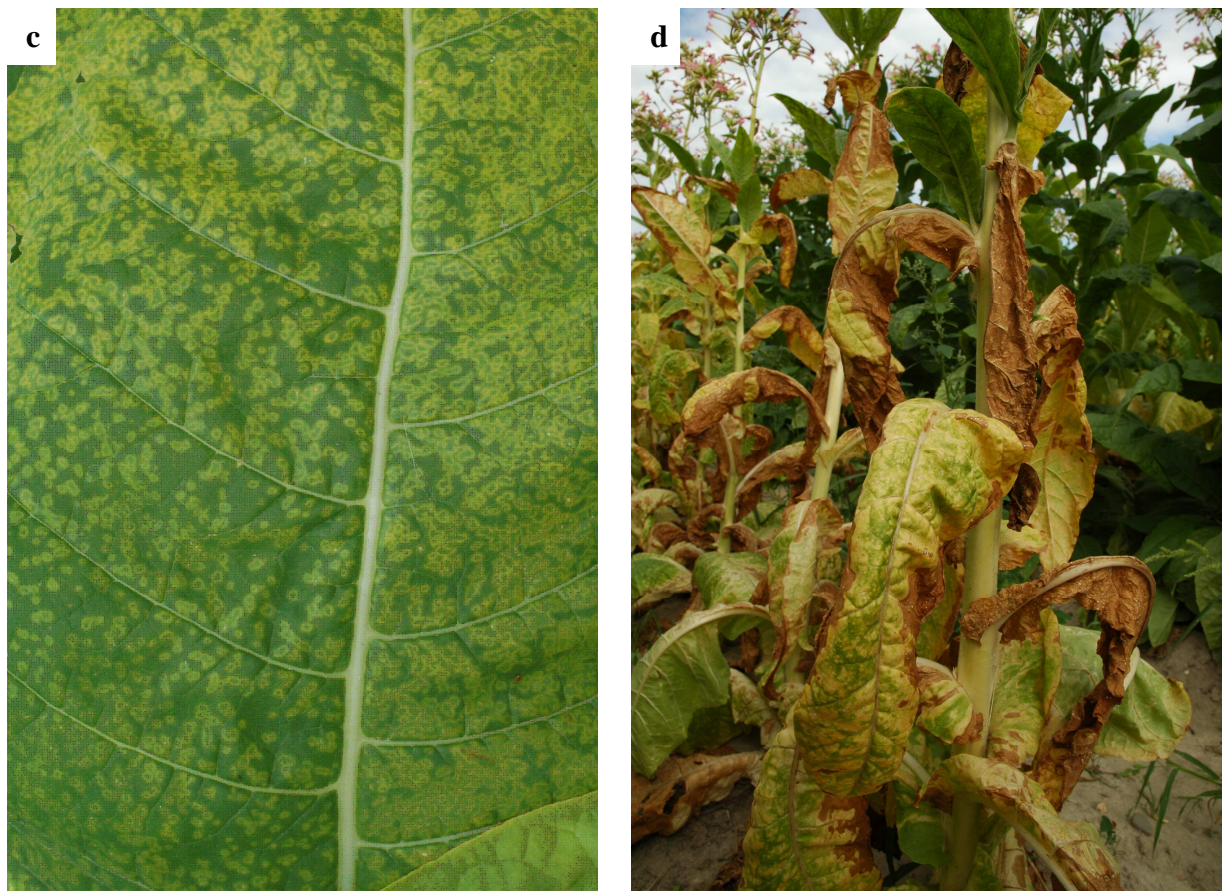
wykorzystano programy: RDP (Martin i in., 2005a), SiScan (Gibbs i in., 2000), wchodzące w skład pakietu RDP. Dla wszystkich badanych izolatów PVY sporządzono mapy genomu uwzględniające miejsca rekombinacji i sekwencje rodzicielskie.

4. Wyniki

4.1. Występowanie wirusa Y ziemniaka (PVY)

W wyniku prowadzonych obserwacji objawów chorobowych w czterech lokalizacjach stwierdzono duże zróżnicowanie porażenia roślin w zależności od odmian, lokalizacji i poszczególnych lat prowadzonych badań. Pierwsze objawy PVY widoczne były jako przejaśnienia nerwów (rys. 12 a), przechodzące następnie w nekrozy (rys. 12 b). Nekrozom nerwów towarzyszyły również chlorotyczne (12 c) i nekrotyczne plamy na blaszce liściowej prowadzące często do zasychania liści i niekiedy łodyg (12 d). Porażenie PVY obserwowano najczęściej na odmianach podatnych, rzadziej na odmianach uznawanych za odporne. Dlatego też te dwie grupy odmian będą omawiane oddzielnie w dalszej prezentacji wyników.

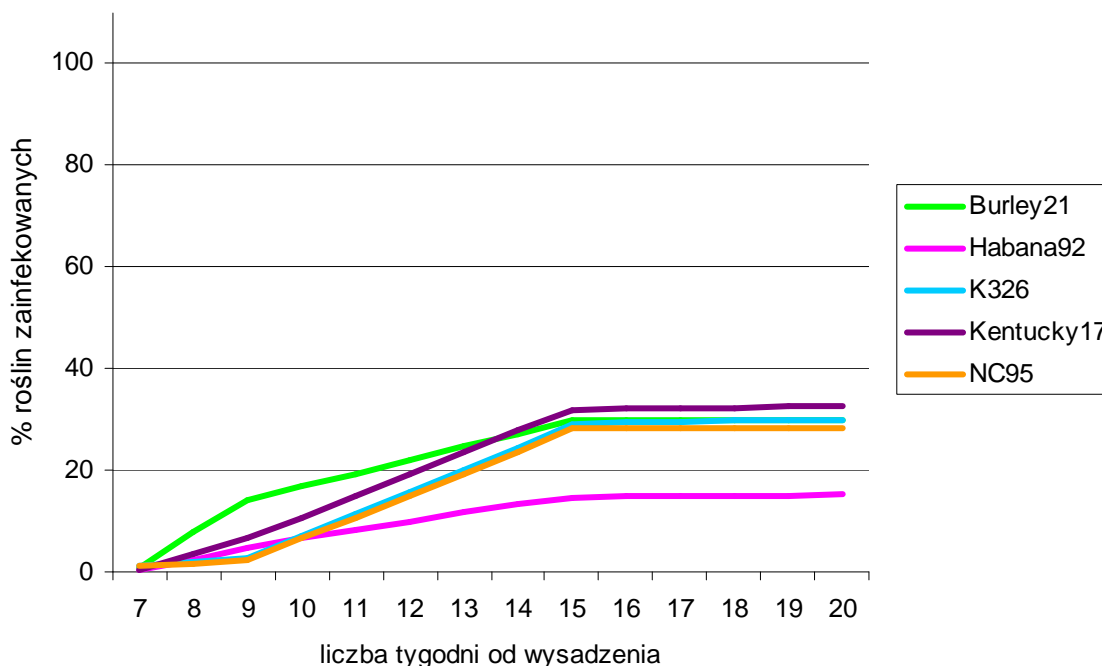




Rys. 12. Objawy PVY w warunkach polowych na odmianach podatnych a) przejaśnienia nerwów, b) nekrozy nerwów, c) chlorotyczne plamy na blaszce liściowej, d) zasychanie liści

4.1.1. Tempo pojawiania się objawów wywoływanych przez PVY

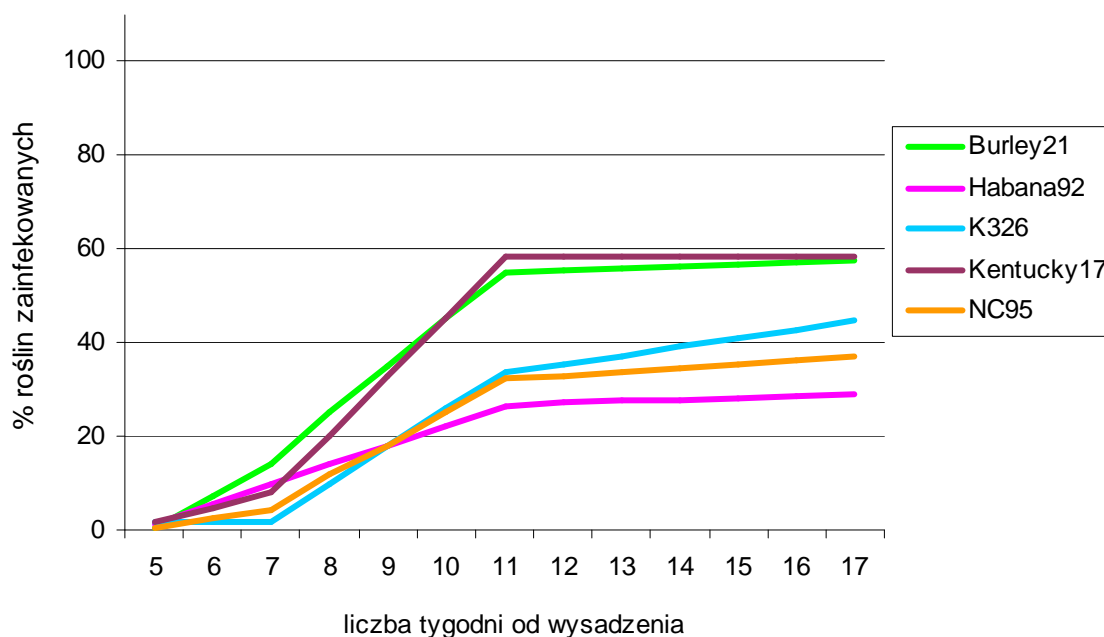
Na podstawie trzyletnich badań prowadzonych w warunkach polowych uzyskano wyniki pozwalające na opracowanie dynamiki pojawiania się objawów chorobowych powodowanych przez PVY. W tym aspekcie uwzględniono tylko odmiany podatne, co pozwoliło na ocenę rozpowszechniania się wirusa w warunkach naturalnej infekcji polowej. W roku 2006 pierwsze objawy pojawiły się siedem tygodni od wysadzenia roślin na pole. Następnie przez kolejne 2 tygodnie rozwój objawów następował bardzo powoli nie przekraczając 10% zainfekowanych roślin, z wyjątkiem odmiany Burley 21, której w 9 tygodniu zainfekowanych było ok. 17% roślin (rys.13). W 15 tygodniu ok. 30% roślin czterech odmian podatnych wykazywało objawy PVY, tylko rośliny odmiany Habana 92 były porażone w 18% . W 20 tygodniu od wysadzenia roślin nie obserwowano wzrostu liczby zainfekowanych roślin w stosunku do stopnia infekcji w 15 tygodniu.



Rys 13. Tempo pojawiania się objawów PVY na odmianach podatnych w Puławach w roku 2006

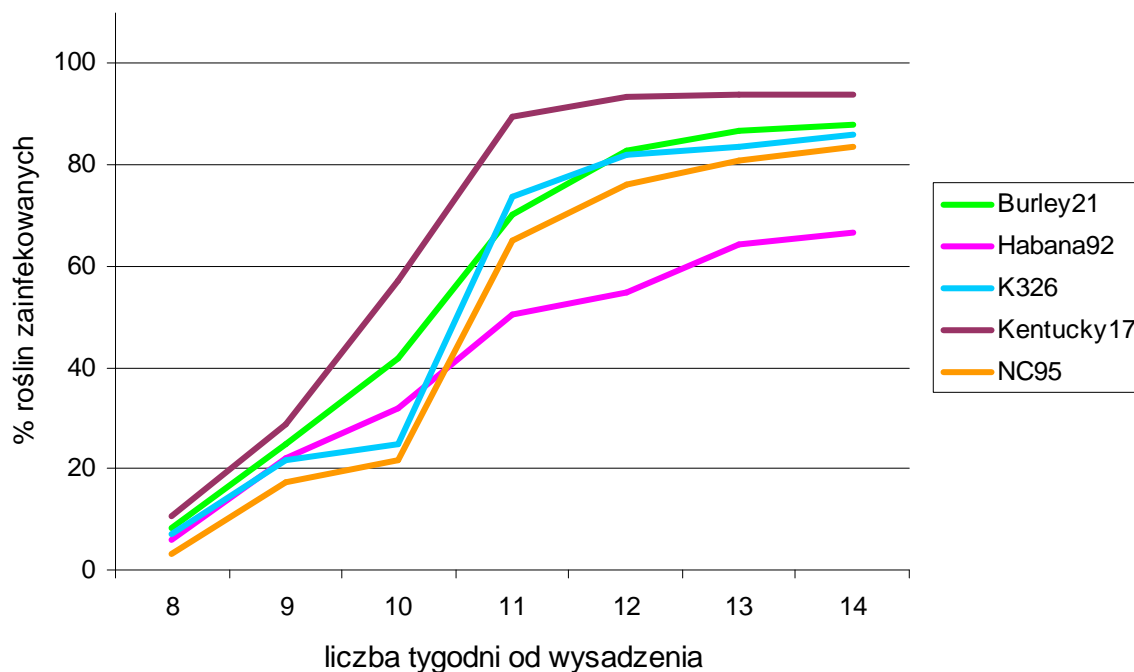
W roku 2007 pierwsze objawy PVY pojawiły się już w 5 tygodniu od wysadzenia roślin na pole o 2 tygodnie wcześniej niż w roku 2006. Niski poziom infekcji utrzymywał się do 7 tygodnia. Następnie obserwowano gwałtowny przyrost liczby zainfekowanych roślin do 11 tygodnia – w szczególności odmian Burley 21 i Kentucky 17 – 60% (rys. 14). Mniej zainfekowanych roślin obserwowano u odmiany K 326 i NC 95. Najmniej zainfekowanych roślin, podobnie jak w poprzednim roku wykazywała odmiana Habana 92. W ciągu kolejnych tygodni odnotowano jedynie niewielki wzrost liczby porażonych roślin odmiany Burley 21, K 326 i NC 95

W kolejnym roku prowadzenia badań pierwsze zainfekowane rośliny obserwowano już w 4 tygodniu, a od 8 tygodnia obserwowano szybkie tempo pojawiania się objawów powodowanych przez PVY (rys.15). W 10 i 11 tygodniu obserwowano gwałtowny wzrost infekcji na odmianie K326 i NC95. Od 11 tygodnia tempo pojawiania się nowych infekcji było już znacznie wolniejsze. Poziom roślin porażonych w tym roku był bardzo wysoki, zwłaszcza u odmiany Kentucky 17 i przekroczył 90% ogółu badanych roślin. W ponad 80% zainfekowane były odmiany Burley 21, K326 i NC 95. Podobnie jak w latach ubiegłych najwolniej i najsłabiej porażona przez PVY była odmiana Habana 92.

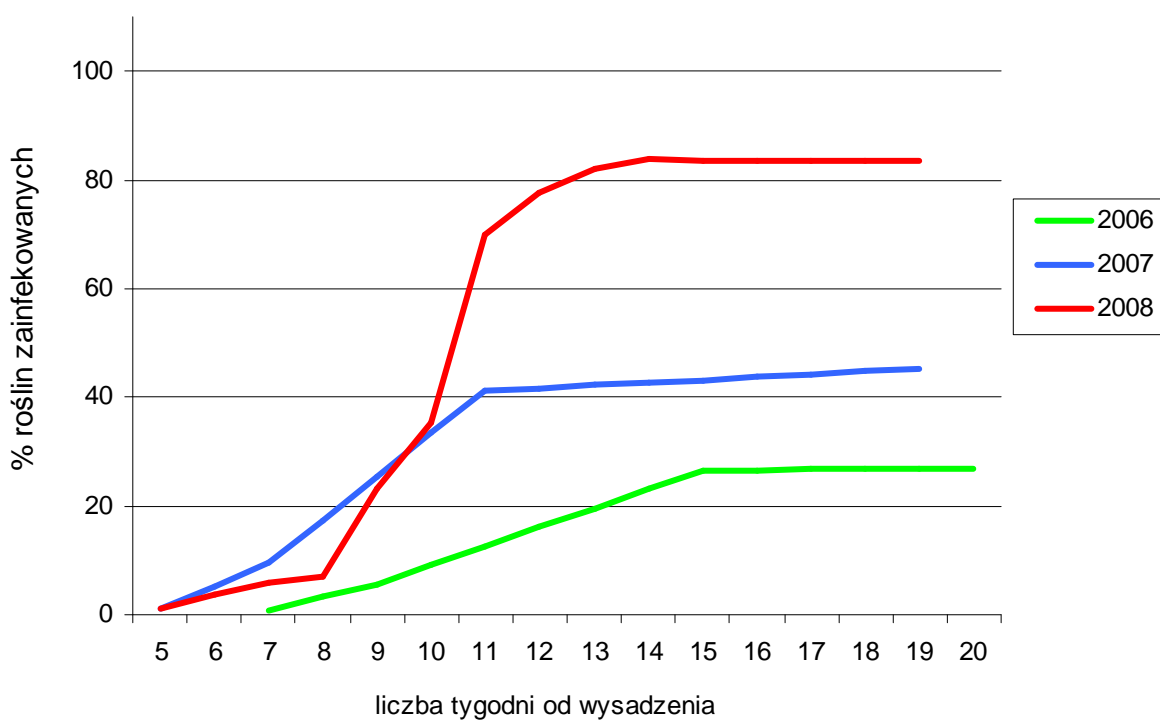


Rys 14. Tempo pojawiania się objawów PVY na odmianach podatnych w Puławach w roku 2007

Porównując wrażliwość badanych odmian na infekcję PVY, we wszystkich latach prowadzenia badań najszybciej ulegała porażeniu odmiana Kentucky17, która była też porażona w najwyższym stopniu. Najwolniej infekcji ulegała odmiana Habana 92. Porównując tempo pojawiania się objawów PVY na odmianach podatnych można zauważyć, że najwolniej choroba rozwijała się w 2006 roku i do 15 tygodnia od wysadzenia roślin na pole porażonych było mniej niż 30% roślin, podczas gdy w roku 2007 już w 11 tygodniu poziom porażenia przekraczał 40%. Rok 2008 charakteryzował się bardzo szybkim tempem infekcji tytoniu, szczególnie pomiędzy 8, a 11 tygodniem od wysadzenia roślin na pole i w 11 tygodniu wynosił około 70%, natomiast w 14 tygodniu ponad 80% (rys. 16).



Rys. 15. Tempo pojawiania się objawów PVY na odmianach podatnych w Puławach w roku 2008



Rys. 16. Tempo pojawiania się objawów PVY na odmianach podatnych w Puławach w latach 2006-2008

4.1.2. Infekcja odmian podatnych w różnych rejonach kraju

Średnie wartości zainfekowanych roślin odmian podatnych były zróżnicowane zarówno w zależności od lokalizacji doświadczenia, jak również roku prowadzenia badań

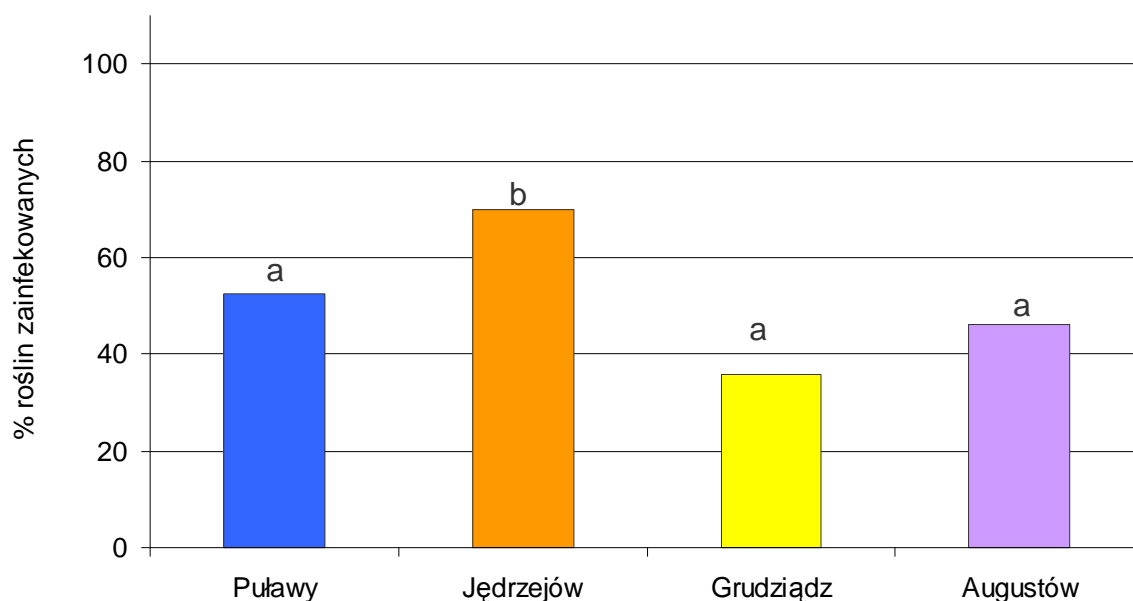
(tab. 1). W roku 2006 najsilniej infekowane były rośliny w Jędrzejowie i w Augustowie, nie przekraczając jednak 50%. W kolejnym roku największą liczbę zainfekowanych roślin, odpowiednio 62% i 45%, obserwowano w Jędrzejowie i Puławach. Zdecydowanie największą liczbę zainfekowanych roślin obserwowano w roku 2008. We wszystkich lokalizacjach porażenie przekroczyło 80%, zaś w Grudziądzu i Jędrzejowie stanowił aż 97%. Najmniej zainfekowanych roślin odnotowano w 2006 r. w Grudziądzu oraz w 2007 roku w Augustowie.

Tabela 1. Procentowy udział roślin odmian podatnych zainfekowanych PVY w latach 2006-2008 w zależności od lokalizacji doświadczenia

Lokalizacja	Procentowy udział zainfekowanych roślin		
	Lata		
	2006	2007	2008
Puławy	27 ^a	45,3 ^b	83,6 ^c
Jędrzejów	49,6 ^a	62 ^b	97,1 ^c
Grudziądz	11 ^a	23,1 ^b	96,8 ^c
Augustów	35,1 ^a	15,3 ^b	88,5 ^c

objaśnienie: wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $\alpha < 0,05$

Analizując infekcje odmian podatnych tytoniu w zależności od lokalizacji stwierdzono statystycznie istotne wyższe porażenie w Jędrzejowie w stosunku do pozostałych lokalizacji. Średnia z trzech lat prowadzonych badań wynosiła tam 69,8%, podczas gdy w pozostałych lokalizacjach zawierała się w granicach 35,7-52,4% (rys. 17). Najmniej zainfekowanych roślin odnotowano w Grudziądzu i Augustowie.



Rys. 17. Objawy PVY na roślinach odmian podatnych w zależności od lokalizacji doświadczenia

W grupie odmian podatnych niezależnie od roku najslabiej porażane były rośliny odmiany Habana 92, najsilniej zaś Kentucky 17 (tab. 2). W latach 2006-2007 nie występowały statystycznie istotne różnice w nasileniu infekcji roślin, ale już w roku 2008 było ono istotnie wyższe w stosunku do lat ubiegłych i dla 4 odmian przekraczało 90%. Jedynie odmiana Habana 92 porażana była nieco słabiej, w 78,5%.

Tabela 2. Nasilenie infekcji roślin odmian podatnych wirusem Y ziemniaka w zależności od odmiany w latach 2006-2008

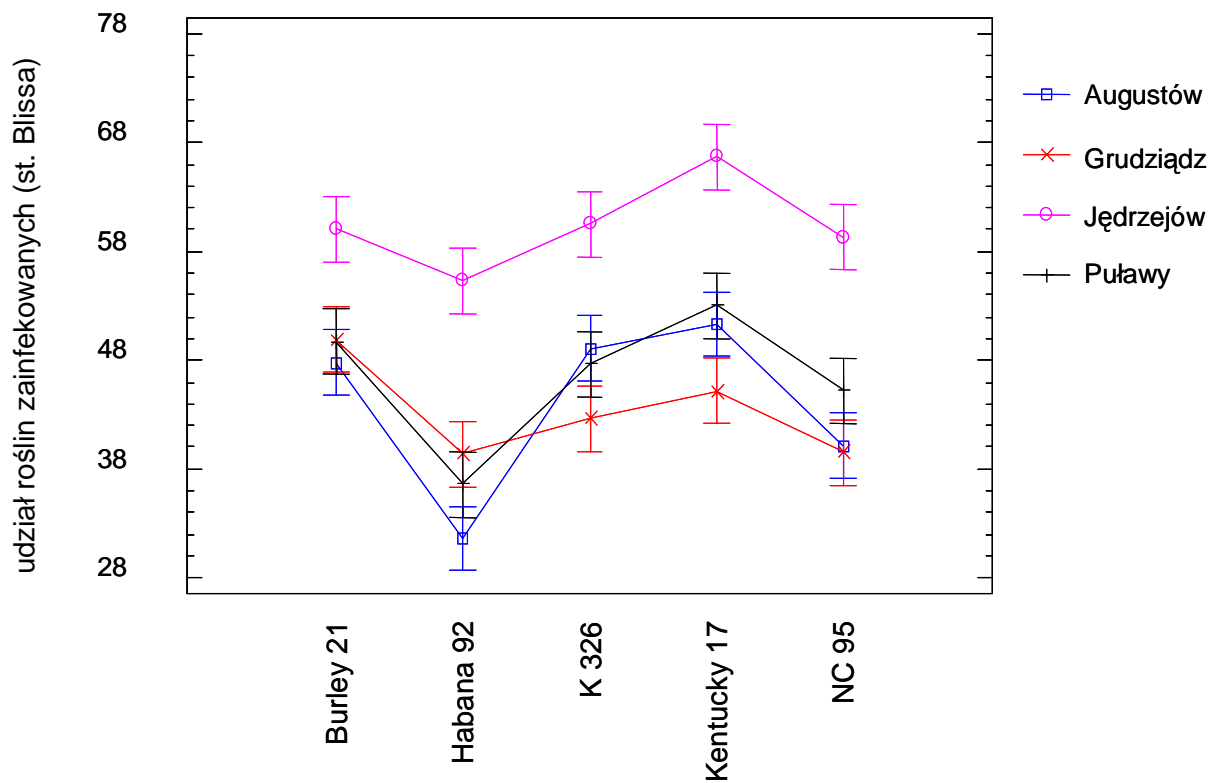
Odmiana	% porażonych roślin		
	Lata		
	2006	2007	2008
Burley 21	35,2 ^a	45,6 ^b	92,2 ^c
Habana 92	21,1 ^a	25,5 ^b	78,5 ^c
K 326	26,6 ^a	37,2 ^b	94,4 ^c
Kentucky 17	33,7 ^a	48,7 ^b	95,7 ^c
NC 95	20,4 ^a	31,2 ^b	92,7 ^c

objaśnienie: wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $\alpha < 0,05$

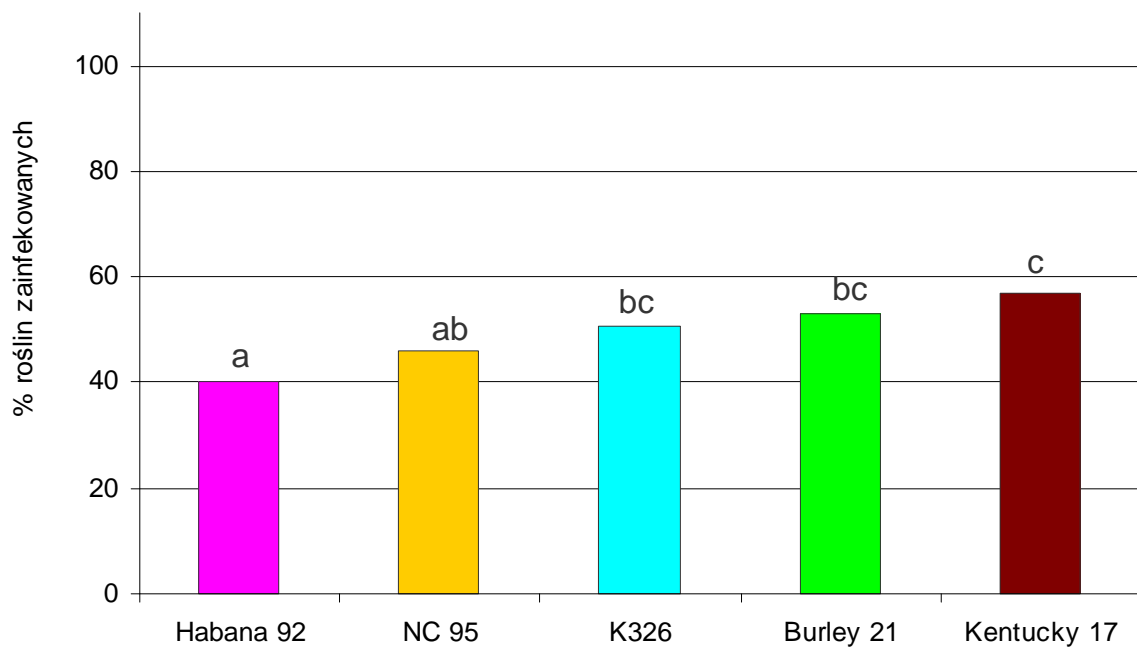
Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w liczbie zainfekowanych roślin poszczególnych odmian podatnych w Augustowie, Grudziądzu i Puławach. Jedynie lokalizacja Jędrzejów charakteryzowała się istotnie wyższymi infekcjami odmian (rys. 18).

W grupie odmian podatnych najmniej porażona była Habana 92 (40,3%), NC 95 (46,2%) i K 326 (50,8%) i poziom ich infekcji był istotnie niższy względem poziomu infekcji u odmiany Burley 21 (53,1%) i Kentucky 17 (57,1%) (rys. 19).

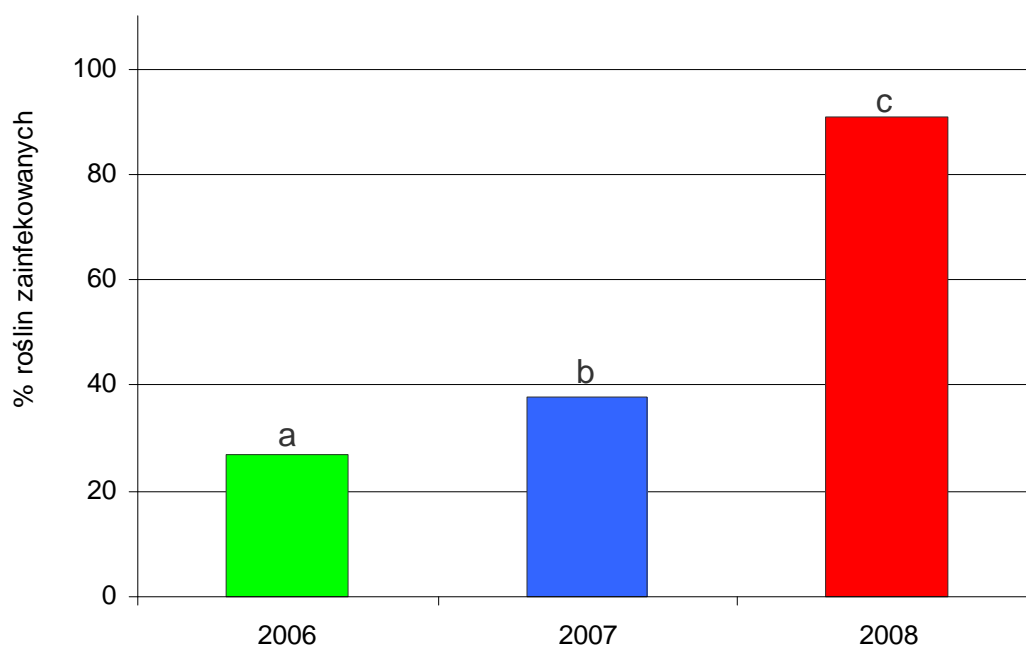
Biorąc po uwagę rok prowadzenia doświadczeń stwierdzono, że z roku na rok poziom infekcji odmian podatnych wzrastał od 27% w roku 2006, przez 37,7% w 2007 do 90,7% w roku 2008 (rys. 20). W kolejnych latach różnica porażenia była istotnie większa niż w roku poprzednim.



Rys. 18. Nasilenie infekcji roślin odmian podatnych wirusem Y ziemniaka w zależności od odmiany w 4 lokalizacjach



Rys. 19. Nasilenie infekcji roślin odmian podatnych wirusem Y ziemniaka w zależności od odmiany



Rys. 20. Nasilenie infekcji roślin odmian podatnych wirusem Y ziemniaka w zależności od roku prowadzenia doświadczeń

4.1.3. Reakcja odmian odpornych na PVY

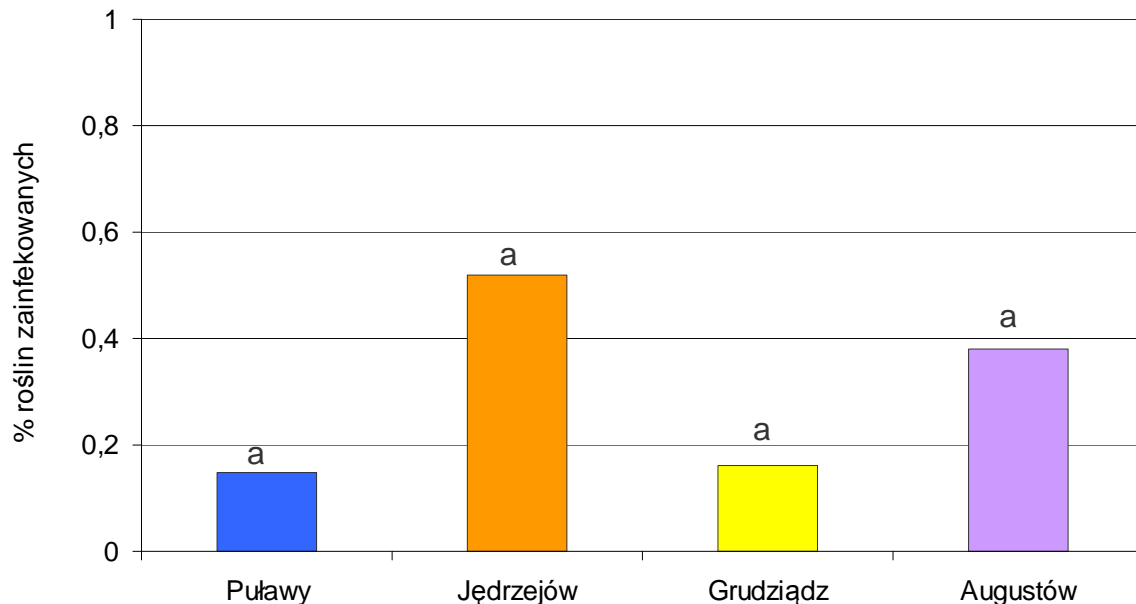
W warunkach naturalnej infekcji polowej odmiany uznane za odporne na wirusa wykazywały niskie porażenie. W roku 2006 nie obserwowano zainfekowanych roślin w żadnej z lokalizacji. W 2007 roku odnotowano pojedyncze przypadki zainfekowania roślin w Augustowie i Grudziądzu. W Puławach zainfekowanych było niespełna 0,5% roślin, zaś w Jędrzejowie 1%. W roku 2008 najwięcej zainfekowanych roślin obserwowano w Jędrzejowie – prawie 2%, w Augustowie i Grudziądzu poniżej 1%, a w Puławach infekcji nie uległa żadna roślina (tab. 3).

Tabela 3. Procentowy udział roślin odmian odpornych zainfekowanych PVY w latach 2006-2008 w zależności od lokalizacji doświadczenia

Lokalizacja	% porażonych roślin		
	2006	2007	2008
Puławy	0 ^a	0,44 ^a	0 ^a
Jędrzejów	0 ^{ab}	1 ^{ab}	1,9 ^{bc}
Grudziądz	0 ^a	0,1 ^a	0,62 ^a
Augustów	0 ^a	0,17 ^{ab}	0,94 ^{bc}

objaśnienie: wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $\alpha < 0,05$

Średnia liczba zainfekowanych roślin odmian odpornych za okres trzech lat prowadzenia badań nie wykazywała statystycznie istotnych różnic i wynosiła od 0,15% do 0,52% (rys. 21). Podobnie jak w przypadku odmian podatnych tak i tu najczęściej zainfekowanych roślin obserwowano w Jędrzejowie.



Rys. 21. Objawy PVY na roślinach odmian odpornych w zależności od lokalizacji doświadczenia

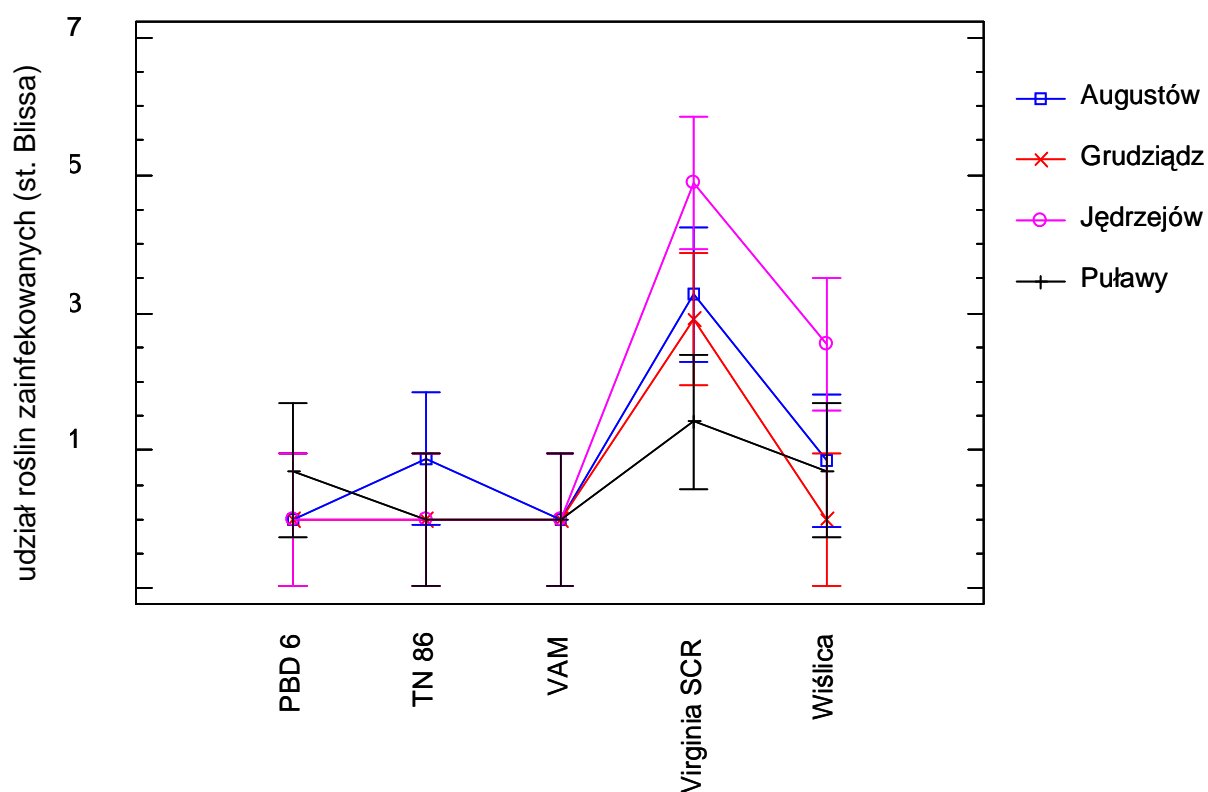
Wszystkie odmiany z grupy odmian odpornych wykazywały niską infekcję PVY. Najczęściej porażaną odmianą była Virginia SCR (VD). W jej przypadku z roku na rok zainfekowanych było coraz więcej roślin od 0,4% w 2006 roku do 2,5% w roku 2008 (tab. 4). Rzadziej infekowana była odmiana Wiślica do 0,5%. Odmiany TN 86 i PBD 6 zostały zainfekowane jedynie w roku 2007, a ich udział nie przekroczył 0,2% ogółu roślin badanych w tej grupie. Jedynie odmiana VAM nie uległa infekcji w warunkach polowych przez cały okres prowadzenia badań.

Tabela 4. Nasilenie infekcji roślin odmian odpornych przez PVY w zależności od odmiany w latach 2006-2008

Odmiana	% porażonych roślin		
	2006	2007	2008
VAM	0 ^a	0 ^a	0 ^a
TN 86	0 ^a	0,2 ^a	0 ^a
PBD 6	0 ^a	0,2 ^a	0 ^a
Virginia SCR (VD)	0,4 ^a	0,7 ^a	2,5 ^b
Wiślica	0 ^a	0,4 ^a	0,5 ^a

objaśnienie: wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $\alpha < 0,05$

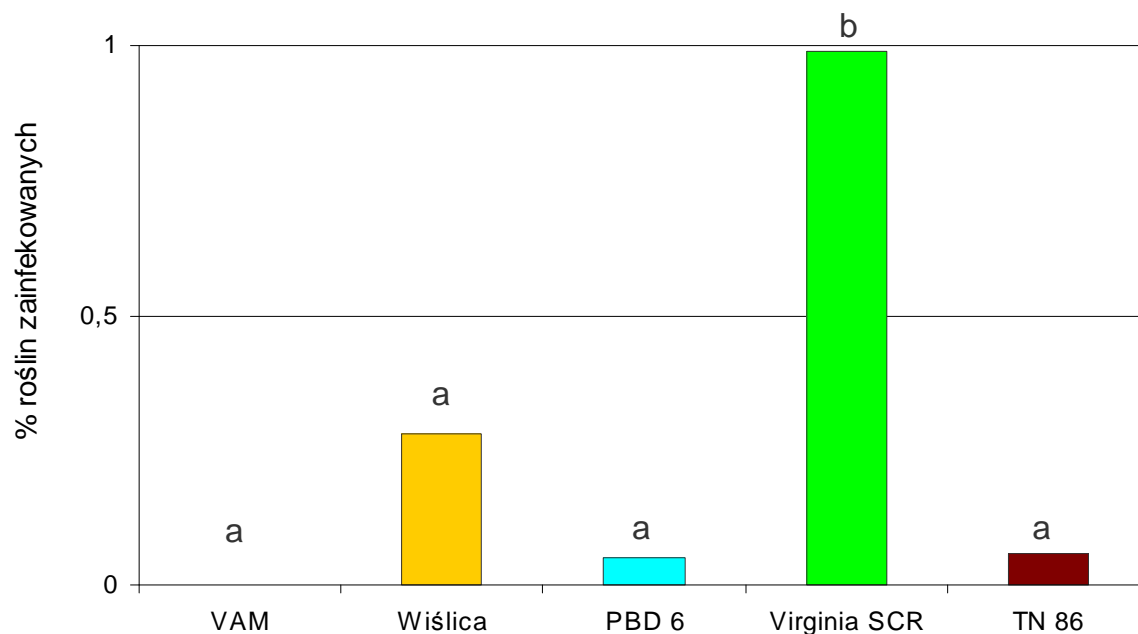
W odniesieniu do odmian odpornych, odmiany PBD 6, TN 86 i VAM nie wykazywały istotnych statystycznie różnic w liczbie zainfekowanych roślin niezależnie od lokalizacji. Warto jednak zauważyć, iż odmiana Wiślica była statystycznie istotnie częściej infekowana w Jędrzejowie niż w Grudziądzu oraz, że odmiana Virginia SCR była istotnie częściej infekowana w Jędrzejowie niż w Puławach i Grudziądzu (rys.22).



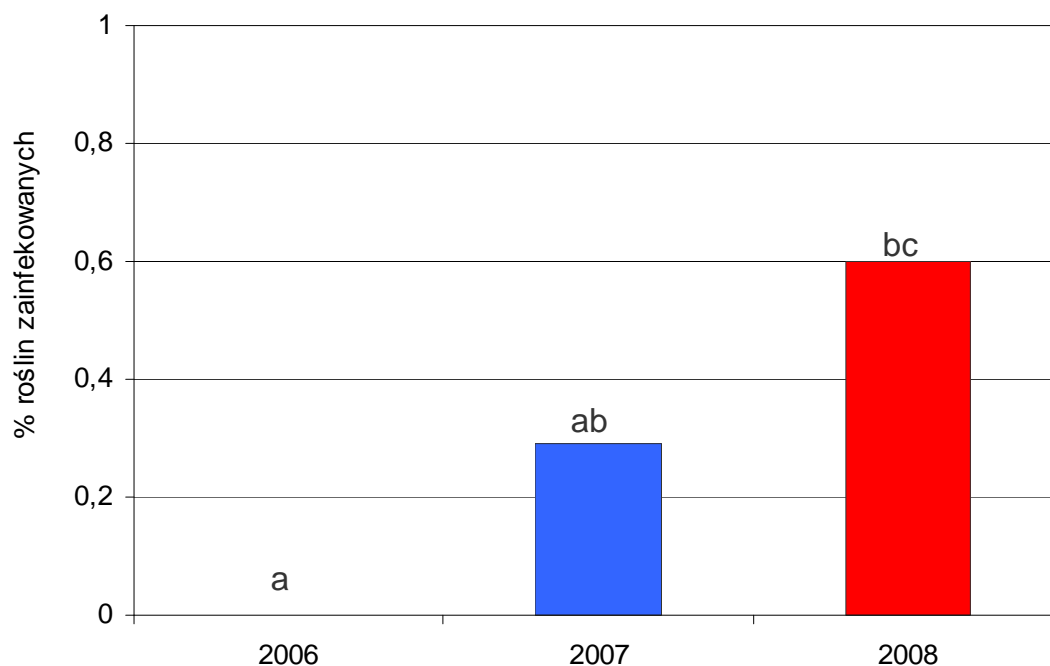
Rys. 22. Nasilenie infekcji roślin odmian odpornych wirusem Y ziemniaka w zależności od odmiany w 4 lokalizacjach

Porównując porażenie odmian odpornych stwierdzono, że cztery odmiany: VAM, Wiślica, PBD 6 i TN 86 nie wykazywały statystycznie istotnych różnic w infekcji przez PVY i udział roślin porażonych nie przekraczał 0,28%. Jedynie odmiana Virginia SCR infekowana była istotnie częściej, osiągając blisko 1% (rys. 23).

W roku 2006 w grupie roślin odmian odpornych nie odnotowano żadnego przypadku PVY. Liczba zainfekowanych roślin tych odmian w roku 2007 wynosiła 0,3%, zaś w roku 2008 było dwukrotnie wyższe i osiągnęła 0,6% (rys. 24).



Rys. 23. Nasilenie infekcji roślin odmian odpornych wirusem Y ziemniaka w zależności od odmiany

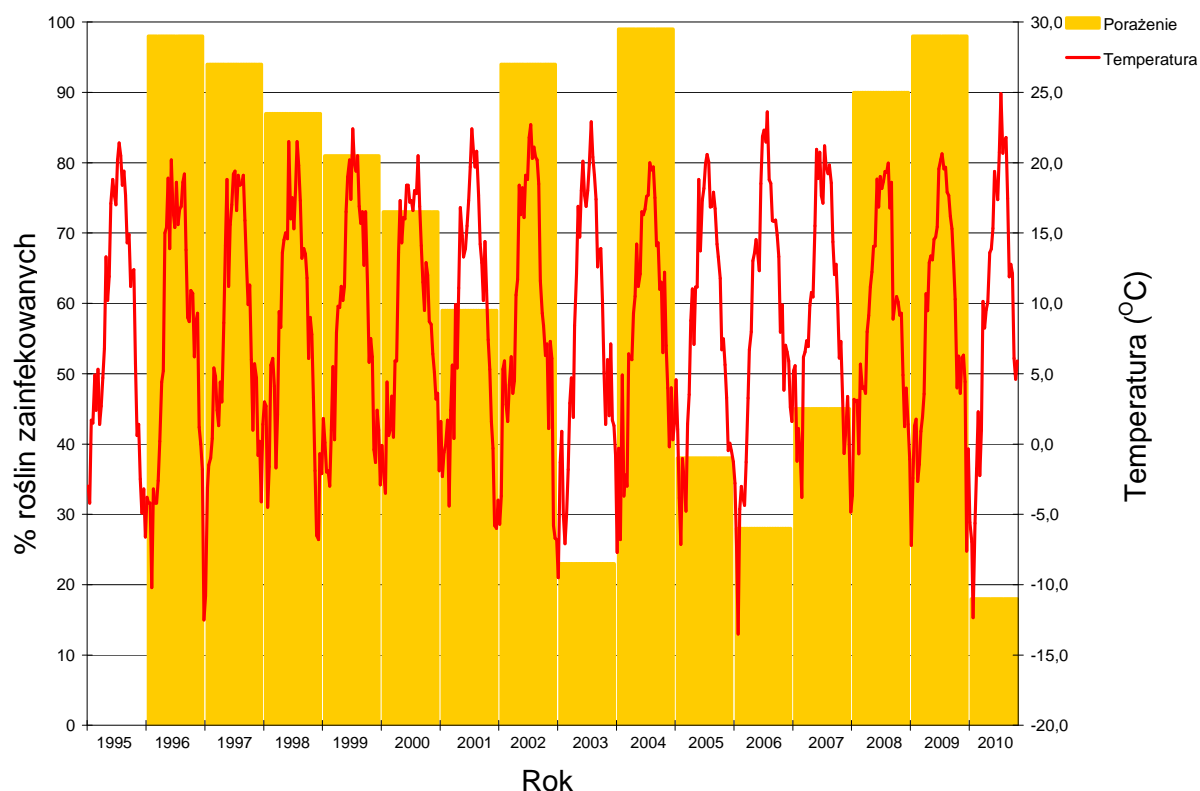


Rys. 24. Nasilenie infekcji roślin odmian odpornych wirusem Y ziemniaka w zależności od roku prowadzenia doświadczeń

4.1.4. Wpływ temperatury powietrza na porażenie tytoniu przez PVY

W celu określenia wpływu warunków pogodowych na infekcję tytoniu przez wirusa Y ziemniaka poszukiwano zależności pomiędzy temperaturą powietrza a udziałem roślin

porażonych. W opracowaniu uwzględniono tylko grupę odmian podatnych. Zależność tą przedstawiono na rys. 25.



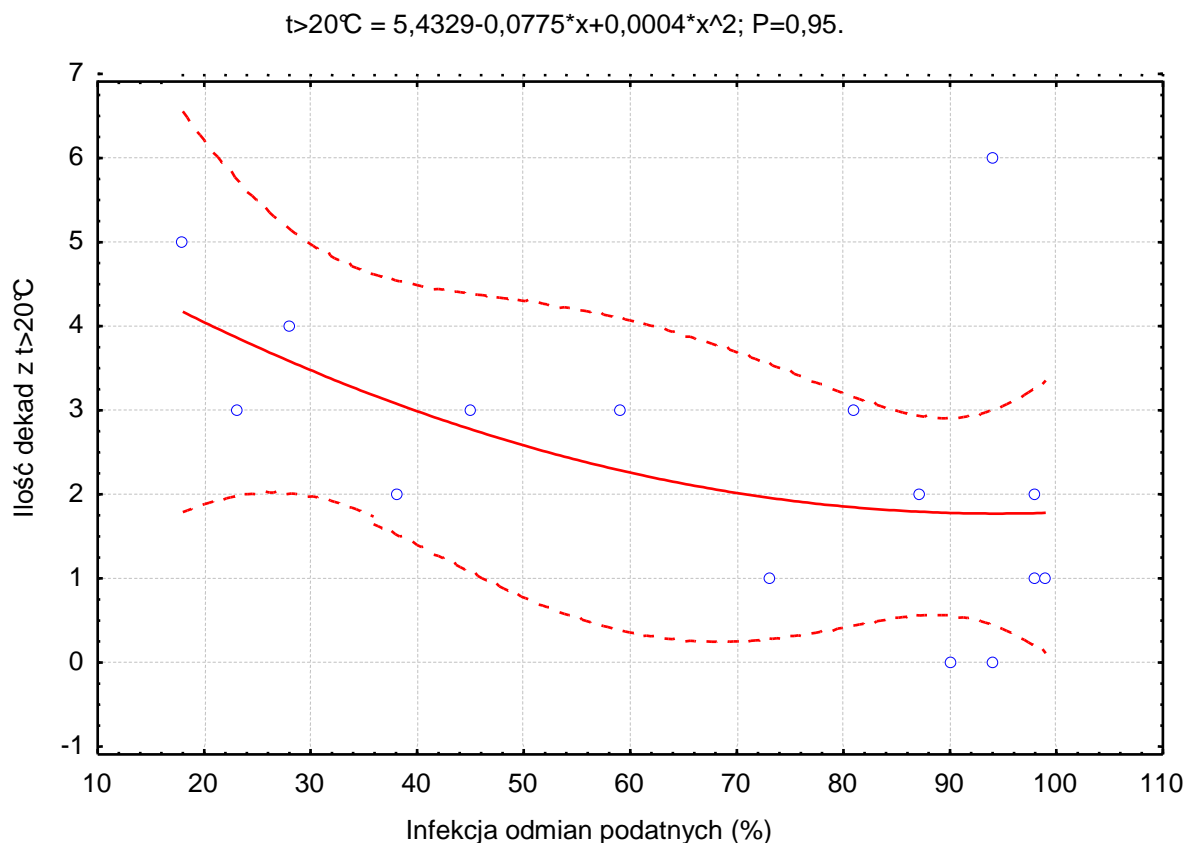
Rys. 25. Zależność infekcji PVY podatnych odmian tytoniu od temperatury powietrza

W tym opracowaniu wykorzystano wyniki z dłuższego okresu badań (1996-2010) zgromadzone przez prof. T. Doroszewską (dane niepublikowane), bowiem badania prowadzone przez autora obejmowały tylko okres 2006-2008. Dane uwzględnione w tym zestawieniu pochodzą z tej samej lokalizacji w Puławach oraz dotyczą tej samej grupy odmian podatnych. Warunki pogodowe (temperatura powietrza) pochodzą ze Stacji Meteorologicznej w Puławach.

Do wyznaczenia korelacji zastosowano współczynnik korelacji rang Spearmana. Założono, że liczba zainfekowanych roślin nie zależy wprost od maksymalnej temperatury w danym roku, lecz od czasu utrzymywania się wysokiej temperatury przez dłuższy okres, dlatego wyliczono ilości dekad z utrzymującą się temperaturą (t) w danym roku, w następujących przedziałach: $t < -7^{\circ}\text{C}$; $-7^{\circ}\text{C} < t \leq -5^{\circ}\text{C}$; $-5^{\circ}\text{C} < t \leq -3^{\circ}\text{C}$; $15^{\circ}\text{C} \leq t \leq 17,5^{\circ}\text{C}$; $17,5^{\circ}\text{C} < t \leq 20^{\circ}\text{C}$; $t > 20^{\circ}\text{C}$. Obliczenia współczynnika korelacji Spearmana dokonano przy poziomie istotności $\alpha=0,05$. Jedynie w przypadku przedziału temperatur $t > 20^{\circ}\text{C}$ uzyskano statystycznie istotny wynik $R=-0,561487$, co oznacza, że długość okresu z utrzymującą się średnią temperaturą powyżej 20°C jest skorelowany z występowaniem roślin zainfekowanych

wirusem. W latach 2003, 2006 i 2010 wysokie temperatury w okresie wegetacji ograniczały nasilenie PVY, które nie przekraczało 30%. Odmianą sytuację obserwowano w 1996, 2004 i 2009 roku, kiedy chłodne lata spowodowały duże nasilenie PVY. Pomimo wcześniejszych przypuszczeń, że mroźne zimy mogą wpływać na populację mszyc – wektora PVY, a tym samym na niższą liczbę zainfekowanych roślin tytoniu, to w świetle uzyskanych wyników stwierdzono, że nie miało to istotnego wpływu na nasilenie choroby.

Na rys. 26 przedstawiono wykres rozrzutu danych wejściowych dla przedziału temperatur $t > 20^{\circ}\text{C}$, przy przedziale ufności $P=95\%$.



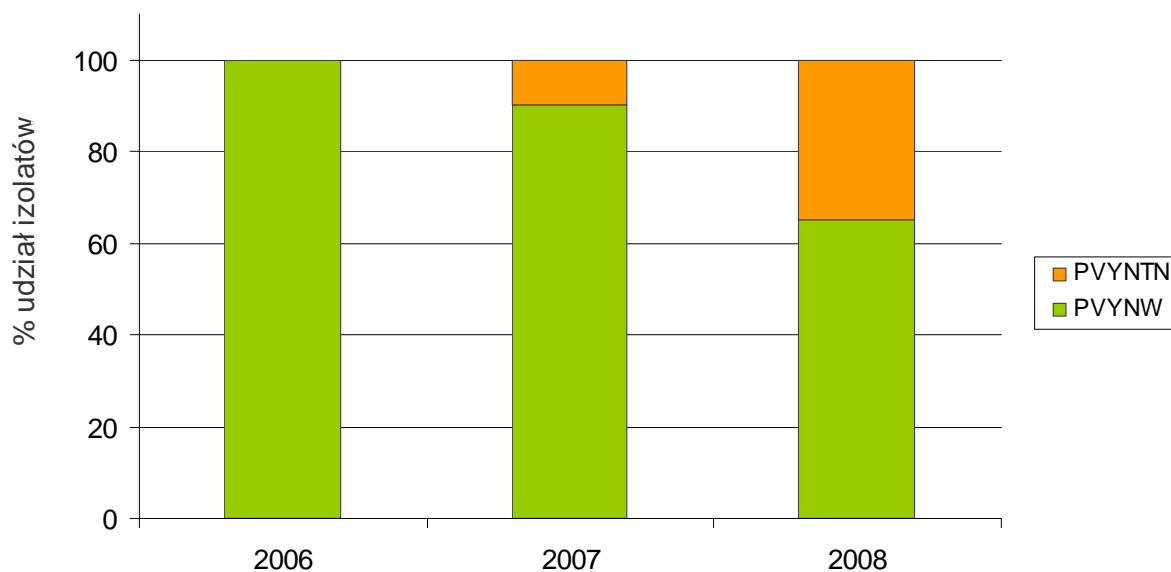
Rys. 26. Wykres rozrzutu ilości dekad z $t > 20^{\circ}\text{C}$, względem zainfekowanych roślin tytoniu. Przerywaną linią oznaczono przedział ufności $P=95\%$. Ciągłą linią czerwoną oznaczono linię trendu dla danych. Niebieskie punkty przedstawiają procentowy udział zainfekowanych roślin odmian podatnych w zależności od ilości dekad z utrzymującą się temperaturą powyżej 20°C .

4.2. Charakterystyka serologiczna izolatów PVY

Poza badaniami dotyczącymi występowania PVY oraz określenia zdolności porażania odmian podatnych i odpornych w warunkach naturalnej infekcji polowej, prowadzono prace mające na celu szeroką charakterystykę zgromadzonych izolatów (zał.1)

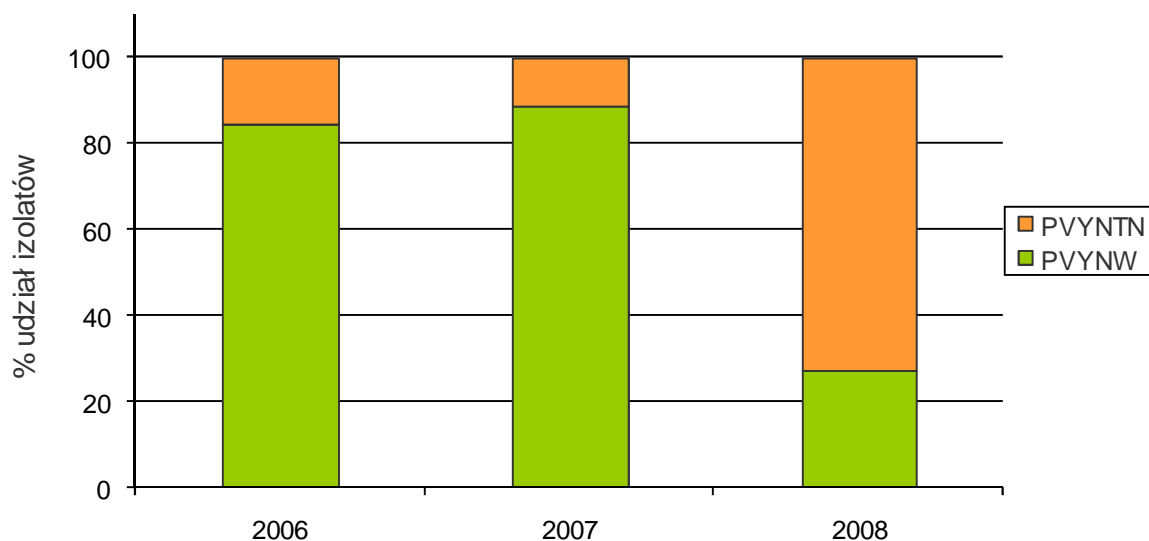
Ważnym elementem charakterystyki było określenie przynależności poszczególnych izolatów wirusa do grupy PVY^{NW} lub PVY^{NTN} w obrębie szczepu nekrotycznego PVY^N. Izolaty grupowano na podstawie testów immunoenzymatycznych (DAS-ELISA).

Jak wykazały badania, wszystkie izolaty zebrane w Puławach w 2006 roku należały do PVY^{NW}. Jednakże w kolejnych latach udział izolatów PVY^{NW} zmniejszał się, natomiast wzrastał udział izolatów PVY^{NTN}. W 2008 roku udział izolatów z grupy PVY^{NTN} wynosił już ponad 35% (rys.27).



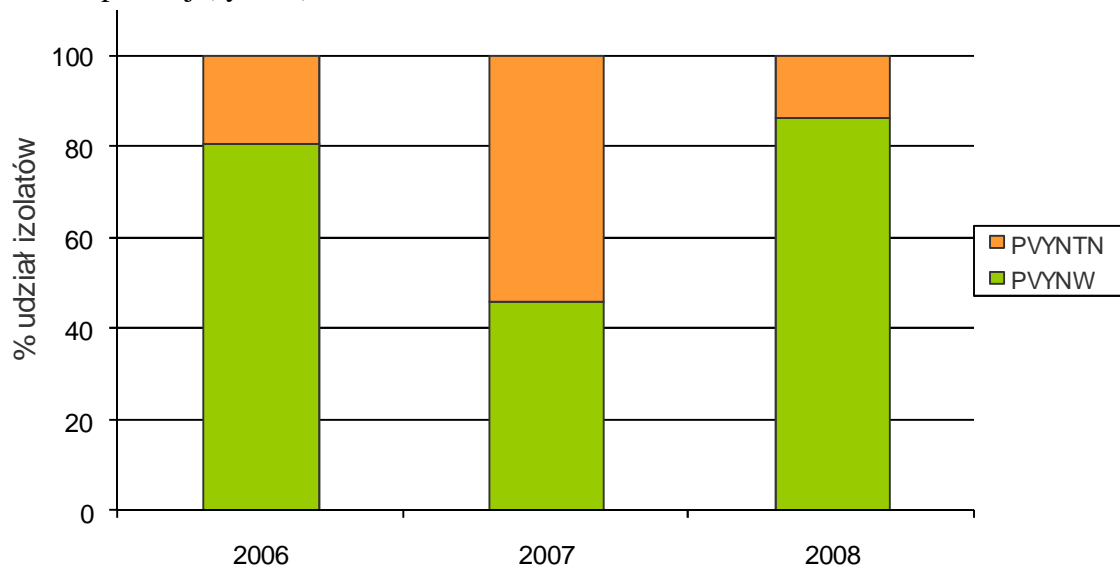
Rys. 27. Procentowy udział izolatów PVY^{NW} i PVY^{NTN} w Puławach w latach 2006-2008

W Jędrzejowie już w roku 2006 izolaty z grupy PVY^{NTN} stanowiły blisko 20% ogółu badanych. Rok później obserwowano nieznaczny spadek ich udziału. W roku 2008 nastąpił drastyczny wzrost ich udziału, sięgający ponad 73% (rys. 28).



Rys. 28. Procentowy udział izolatów PVY^{NW} i PVY^{NTN} w Jędrzejowie w latach 2006-2008

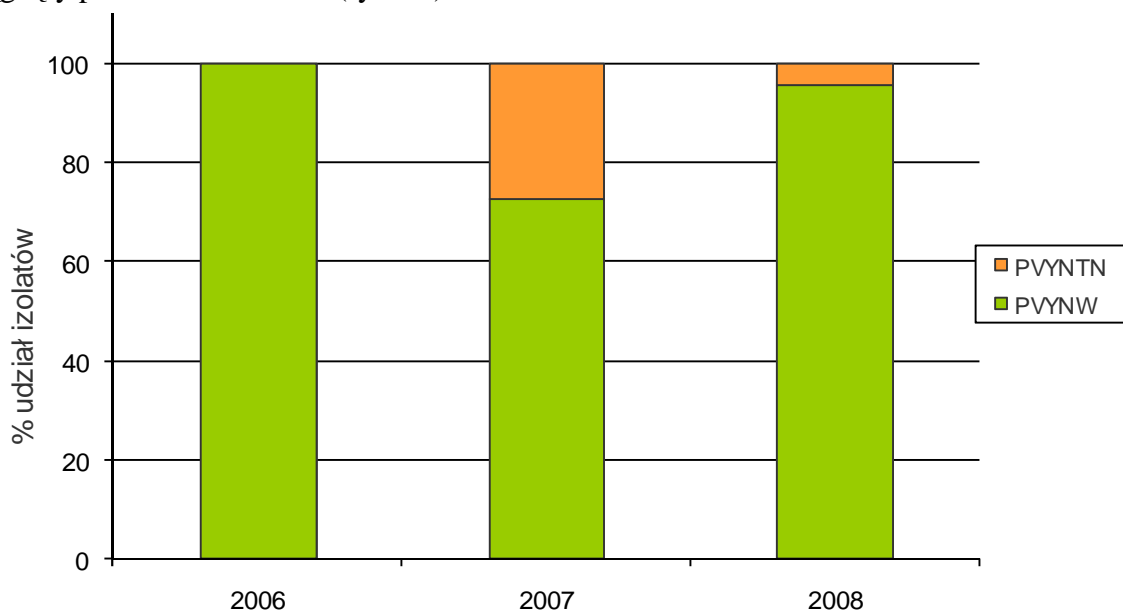
W Grudziądzu największy odnotowany udział izolatów PVY^{NTN}, wyniósł 53,9% w roku 2007. W pozostałych latach był znacząco niższy i wyniósł 19,1% w 2006 roku i ponad 13% 2 lata później (rys. 29).



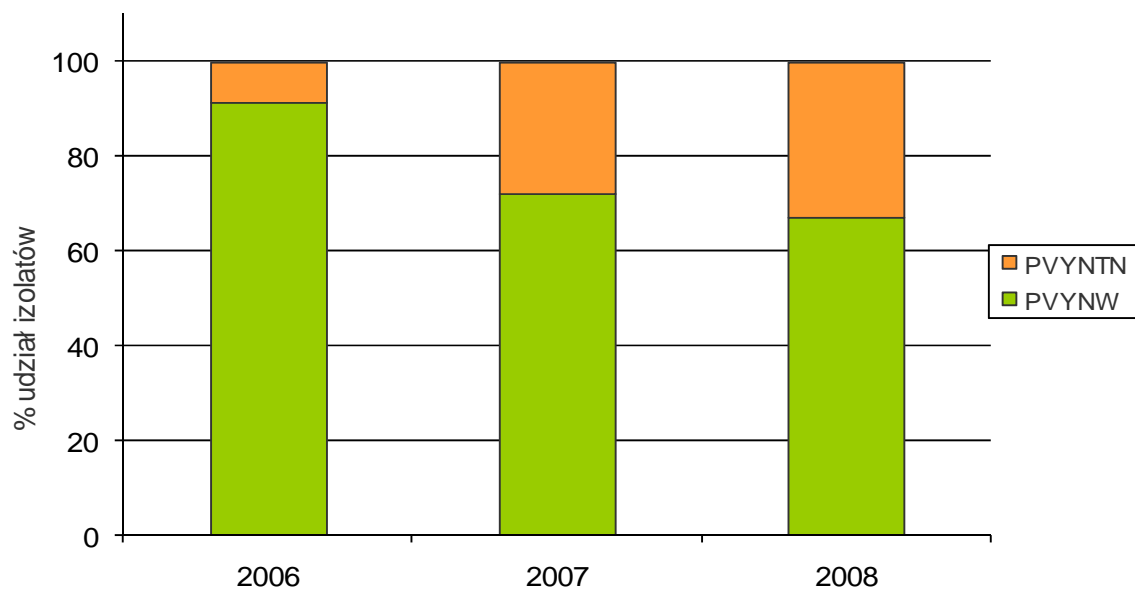
Rys. 29. Procentowy udział izolatów PVY^{NW} i PVY^{NTN} w Grudziądzu w latach 2006-2008

W Augustowie podobnie jak w Puławach w 2006 roku wśród badanych izolatów stwierdzono tylko izolaty z grupy PVY^{NW}. Jednak rok później już prawie jedną trzecią izolatów stanowiły te z grupy PVY^{NTN}. W kolejnym roku obserwowany był ponowny spadek udziału PVY^{NTN} i wynosił on zaledwie 4% (rys. 30).

Biorąc pod uwagę występowanie PVY^{NW} i PVY^{NTN} we wszystkich badanych w tym okresie lokalizacjach daje się zauważyć wyraźny trend zwiększania się udziału izolatów z grupy PVY^{NTN}. W 2006 roku stanowiły one 8,4%, w roku następnym 28%, zaś w 2008 roku osiągnęły poziom blisko 33% (rys. 31).



Rys. 30. Procentowy udział izolatów PVY^{NW} i PVY^{NTN} w Augustowie w latach 2006-2008

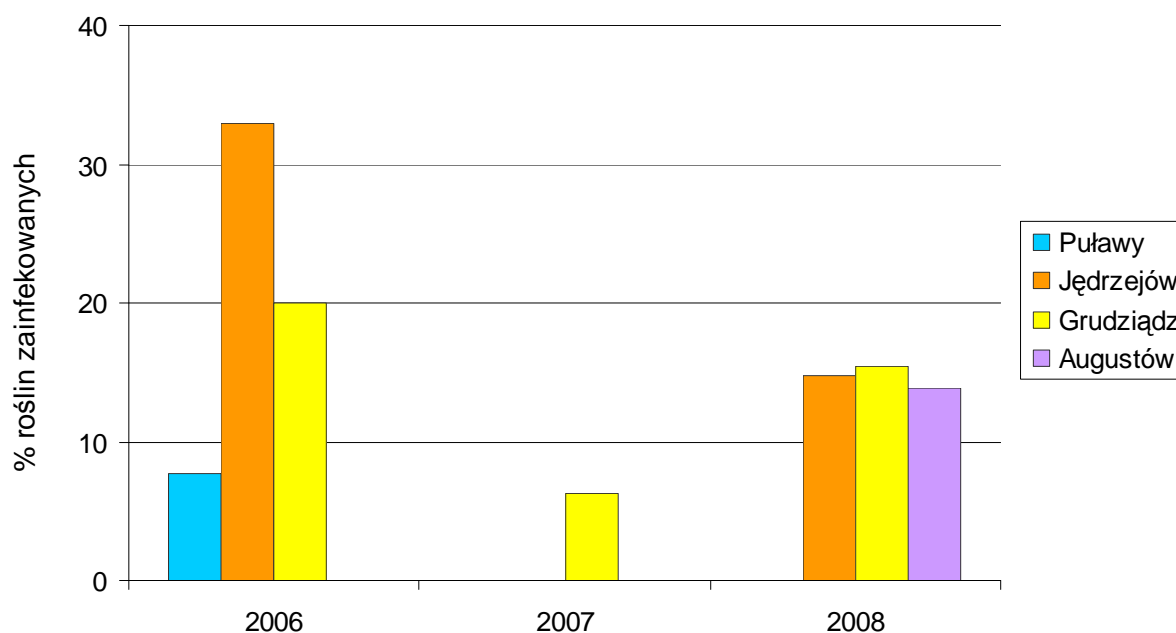


Rys. 31. Procentowy udział izolatów PVY^{NW} i PVY^{NTN} ogółem w Polsce w latach 2006-2008

4.3. Zdolność izolatów PVY do przełamania odporności

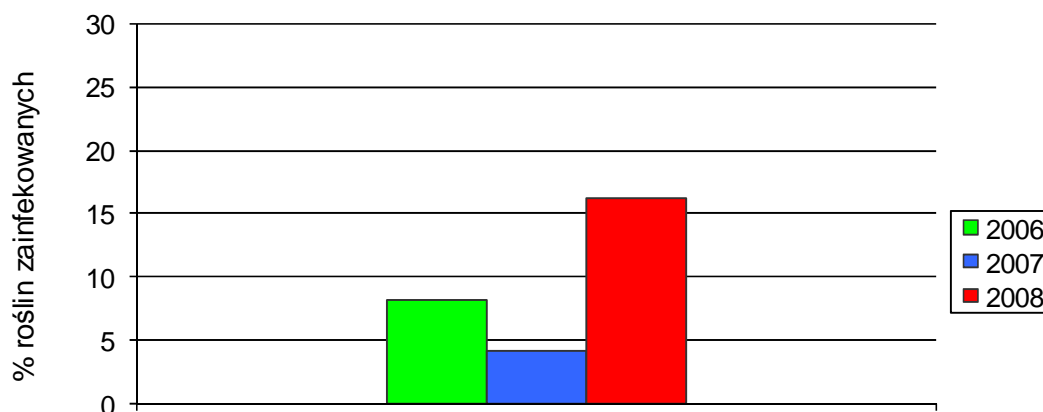
Poza określeniem przynależności badanych izolatów PVY do poszczególnych serotypów prowadzono badania w warunkach szklarniowych nad oceną zdolności do przełamania odporności odmian VAM i Wiślica.

Izolaty zgromadzone w 2006 roku wykazywały duże zróżnicowanie pod względem zdolności do porażania badanych odmian tytoniu. Żaden z izolatów pozyskanych z Augustowa nie przełamał odporności odmian VAM i Wiślica (rys. 32), podczas gdy 30% izolatów pochodzących z Jędrzejowa wykazywało taką zdolność. Izolaty z Grudziądza i Puław, przełamujące odporność typu „va” stanowiły odpowiednio 20% i blisko 10% badanych. Tylko jeden izolat pozyskany w 2007 roku był zdolny do infekowania odmian testowych w warunkach szklarniowych. Najmniejsze zróżnicowanie w zdolności do infekowania odmian testowych wykazywały izolaty wirusa zgromadzone w 2008 roku. Izolaty pochodzące z Jędrzejowa, Grudziądza i Augustowa porażały odmiany odporne tytoniu w około 15%, natomiast puławskie izolaty nie wykazywały takich zdolności.



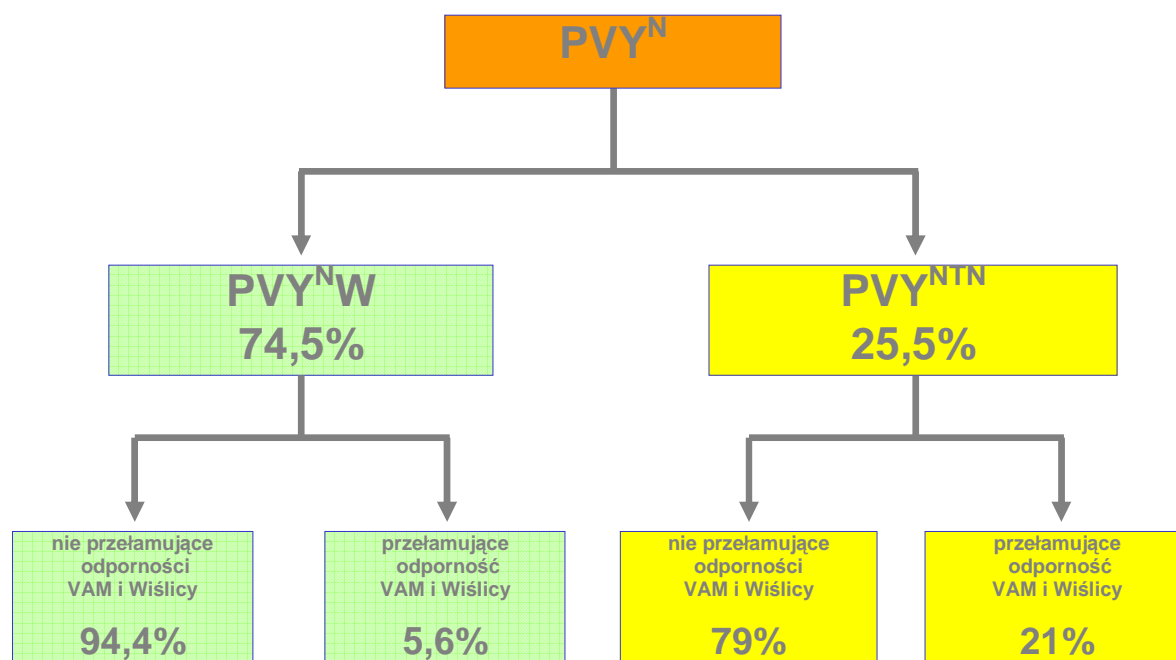
Rys. 32. Udział izolatów PVY przełamujących odporność typu „va” w zależności od miejsca pochodzenia

Porównując izolaty ze wszystkich lokalizacji wykazano, że najwyższy udział izolatów przełamujących odporność odmian VAM i Wiślica stanowiły izolaty pozyskane w 2008 r. (ponad 15%), nieco niższy udział wynoszący ok. 8% stwierdzono wśród izolatów zebranych w roku 2006 i najmniejszy (poniżej 5%) w roku 2007 (rys.33).



Rys. 33. Udział izolatów PVY przełamujących odporność typu „va”

Określono również stosunek izolatów zdolnych i niezdolnych do przełamania odporności typu „va”, w grupie PVY^{NW} i PVY^{NTN} w obrębie szczepu nekrotycznego PVY. Spośród wszystkich zgromadzonych izolatów wirusa, PVY^{NW} stanowiły 74,5%. Wykazano, że w obrębie każdej z tych grup istnieją izolaty zarówno niezdolne jak i zdolne do przełamania odporności typu „va”, przy czym w grupie PVY^{NW} ten stosunek wynosił 19:1, podczas gdy wśród izolatów PVY^{NTN} – 4:1 (rys. 34).

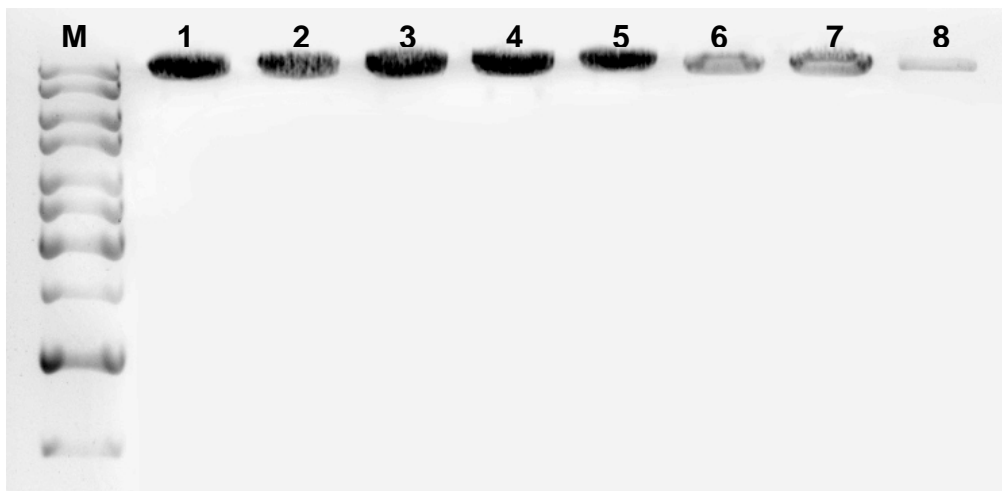


Rys. 34. Procentowy udział izolatów zdolnych i niezdolnych do przełamania odporności w poszczególnych grupach serologicznych

4.4. Analiza molekularna

4.4.1. Otrzymywanie i amplifikacja cDNA wirusa

Z zainfekowanych roślin izolowano całkowite RNA. W reakcji odwrotnej transkrypcji uzyskiwano komplementarny DNA (cDNA) wirusa, który poddawano amplifikacji z wykorzystaniem odpowiednich starterów. W efekcie otrzymywano pełnej długości kopie DNA genomu wirusa Y ziemniaka. Obecność produktów PCR monitorowano w żelu agarozowym (rys. 35).



Rys. 35. Produkty amplifikacji pełnej długości cDNA wirusa Y ziemniaka. M – standard wielkości GeneRuler™ 1kb (Fermentas), ścieżki 1-8 – amplikony otrzymane z różnych izolatów PVY

4.4.2. Trawienie DNA i uzyskiwanie wzorów restrykcyjnych

Uzyskane po amplifikacji cDNA wirusa amplikony, poddawano trawieniu różnymi enzymami restrykcyjnymi. Zastosowano trzy enzymy restrykcyjne *Hin6 I*, *Hinf I* i *Sdu I* rozpoznające sekwencje odpowiednio cztero, pięcio i sześci nukleotydowe. Zmienność w obrębie badanych izolatów wirusa obserwowano na podstawie zmian wzorów restrykcyjnych uzyskanych po trawieniu nukleazami. Mutacja nawet jednego nukleotydu w miejscu rozpoznawanym przez enzym, miała wpływ na powstanie lub utratę miejsca cięcia DNA. W programie RESTDIST tworzono macierz odległości genetycznych, na podstawie której konstruowano drzewa filogenetyczne z zastosowaniem dwóch algorytmów – UPGMA oraz Neighbor-Joining. W sumie z 60 izolatów PVY uzyskano 136 profili RFLP.

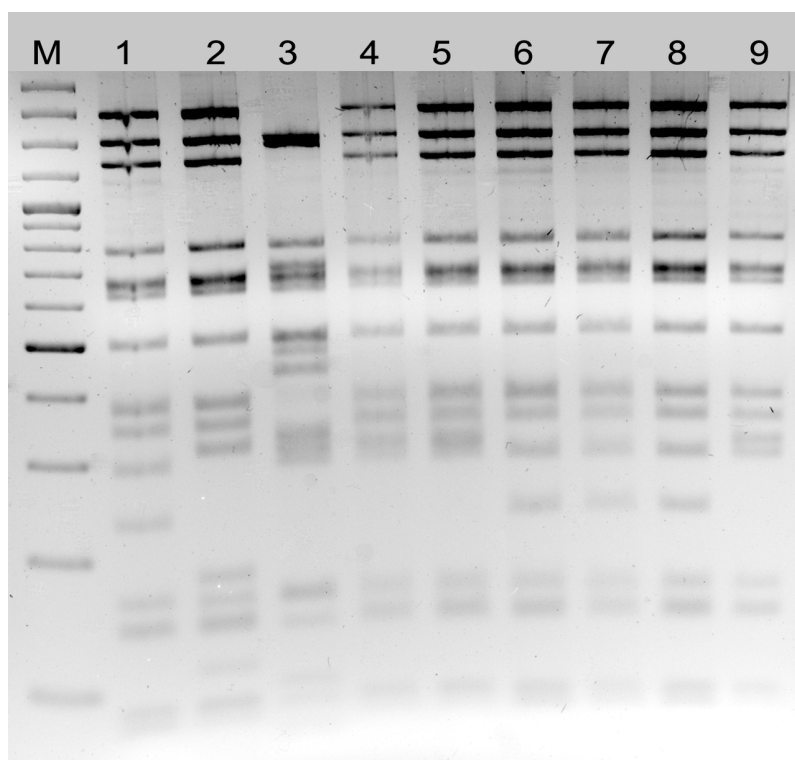
4.4.3. Zmienność genomu izolatów PVY

Oceną zmienności genomu objęto 60 izolatów PVY. Zamplifikowane DNA genomu wirusa poddawane były 3 niezależnym trawieniom przez enzymy restrykcyjne: *Sdu I*, *Hin 6I* i *Hinf I*. Otrzymane fragmenty restrykcyjne rozdzielano w żelach agarozowych (rys. 36-38).

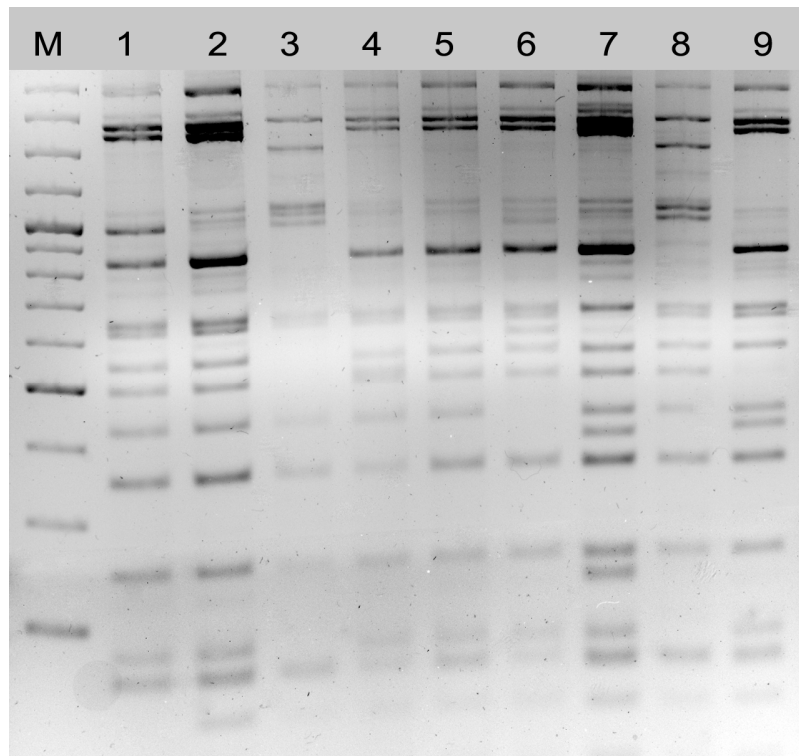
Trawienie przy użyciu enzymu *Hin6I* powodowało powstawanie wzoru restrykcyjnego składającego się z 14 do 16 prążków. U większości izolatów obserwowany był charakterystyczny wzór trzech prążków w obrębie długości fragmentów pomiędzy 1,1 kb, a 1,3 kb, chociaż rzadko spotykany był tu również układ dwóch prążków jak w ścieżce numer 3 (rys. 36). Różnicujący był również zakres od 300-500 bp, gdzie również w ścieżce 3 obserwowany był inny układ prążków. Ponadto w zakresie 100-200 bp obserwowano zmienne wzory restrykcyjne składające się z 2 lub 3 prążków (rys. 36).

Ujawnione podczas trawienia nukleazą *HinfI* wzory restrykcyjne zawierały od 16 do 21 prążków. Dużą zmienność tych wzorów obserwowano od 1,2 kb do 1,3 kb i 800 bp do 1 kb oraz w okolicach 400 bp i 150 bp (rys. 37).

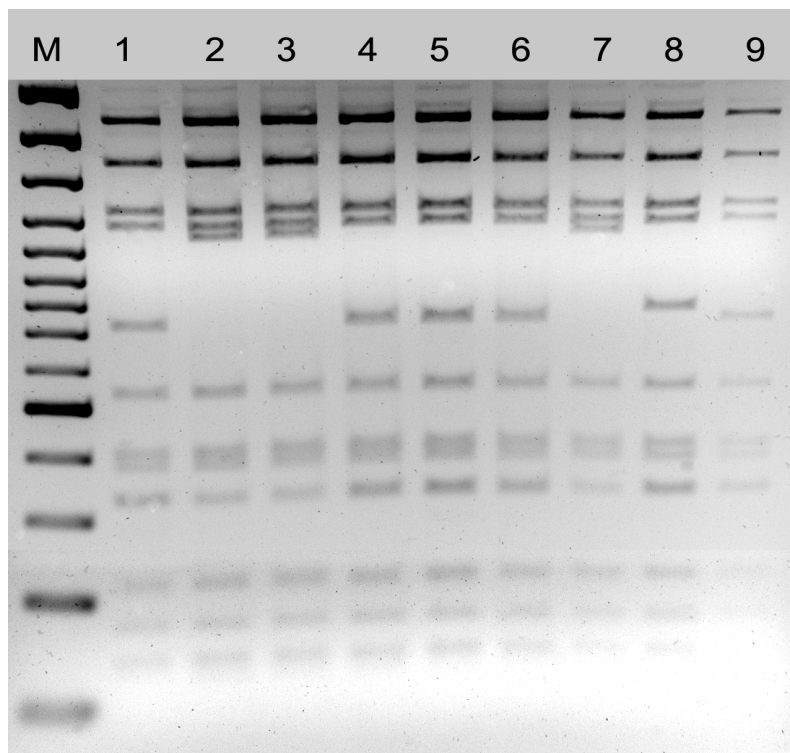
Trawienie enzymem *SduI* generowało 12 prążków, ale w zależności od izolatu ich układ był różny. Obserwowano 2 wzory restrykcyjne różniące się między sobą obecnością lub brakiem prążków o długości 950 bp oraz 740 bp. Warto zauważyć, że obecność prążka 950 bp była związana z nieobecnością prążka 740 bp i odwrotnie (rys. 38).



Rys. 36. Wzory restrykcyjne po trawieniu pełnej długości DNA genomu wirusa Y ziemniaka enzymem *Hin6I*.
M – standard wielkości 100bp DNA Ladder (Fermentas), 1-9 – izolaty PVY



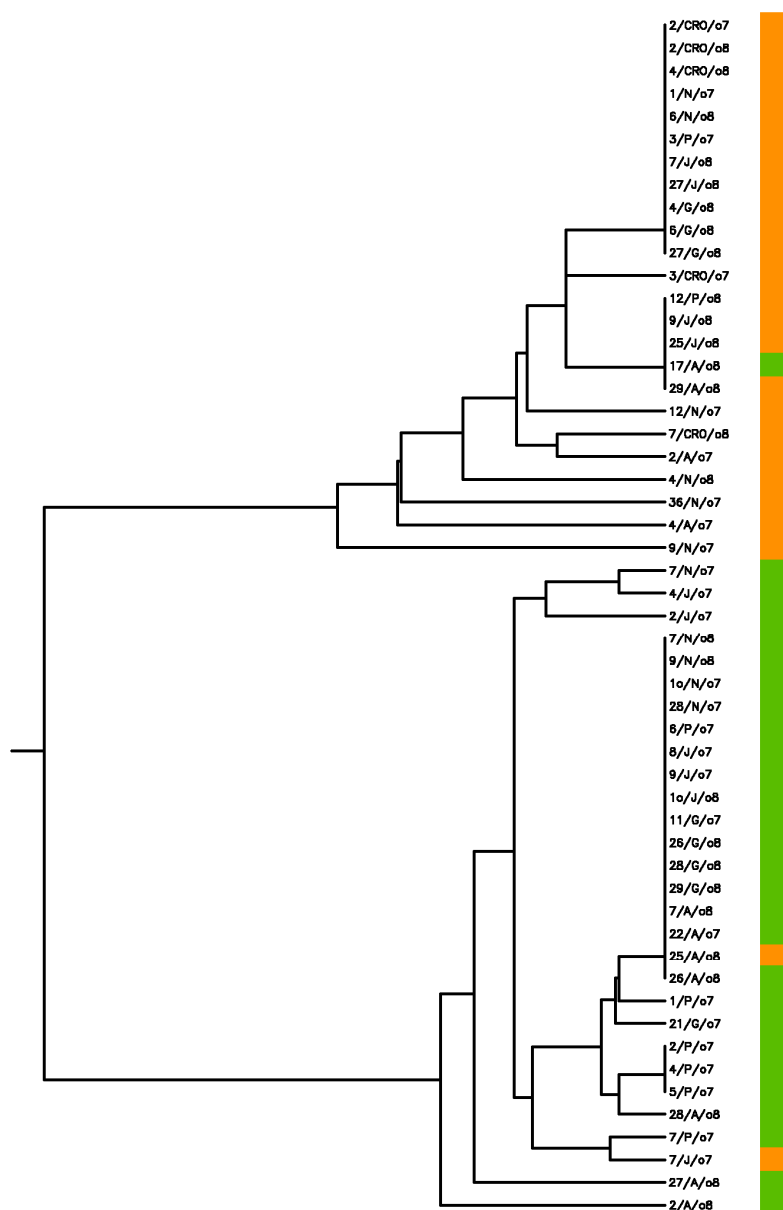
Rys. 37. Wzory restrykcyjne po trawieniu pełnej długości DNA genomu wirusa Y ziemniaka enzymem Hinf I.
M – standard wielkości 100bp DNA Ladder (Fermentas), 1-9 – izolaty PVY



Rys. 38. Wzory restrykcyjne po trawieniu pełnej długości DNA genomu wirusa Y ziemniaka enzymem Sdu I.
M – standard wielkości 100bp DNA Ladder (Fermentas), 1-9 – izolaty PVY

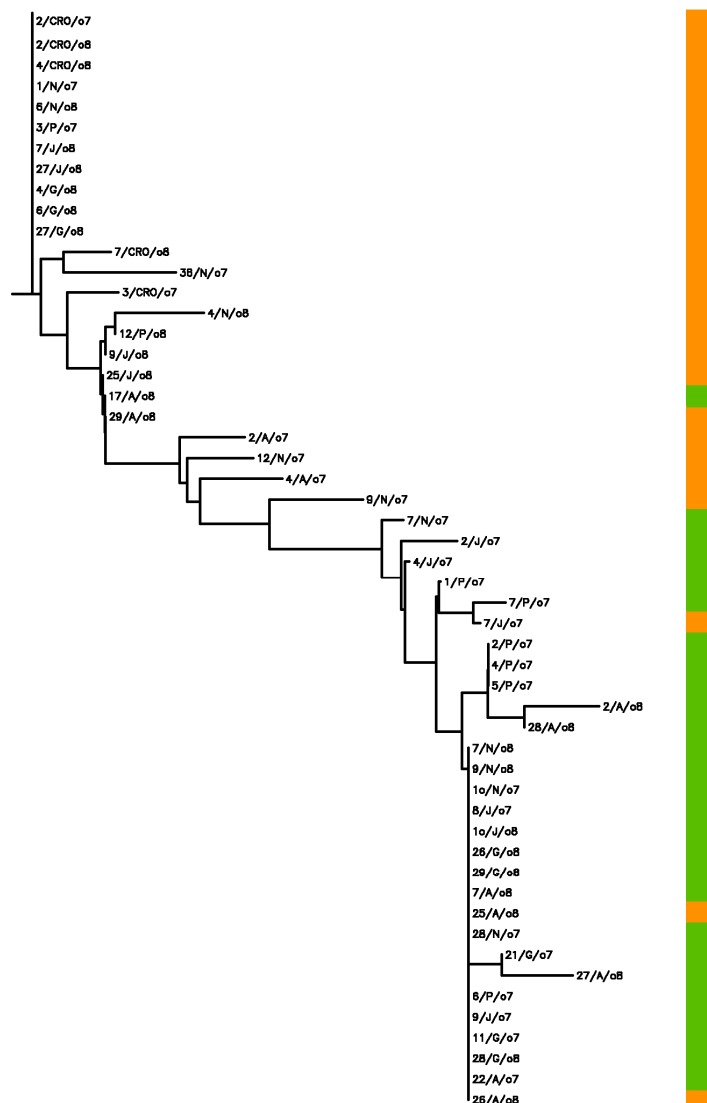
4.4.4. Trawienie enzymem Hin6 I

Uzyskane wzory restrykcyjne po zastosowaniu do analizy filogenetycznej algorytmu UPGMA umożliwiły podział badanych izolatów na 2 klastry. W pierwszym klastrze liczącym 24 obiekty znalazły się niemalże same izolaty z grupy PVY^{NTN} – 23. Wyjątek stanowił izolat 17/A/08. W drugim klastrze obejmującym 29 obiektów, 27 to izolaty z grupy PVY^{NW}. Tutaj wystąpiły 2 izolaty o odmiennych właściwościach serologicznych w stosunku do pozostałych izolatów tego klastra – 25/A/08 i 7/J/07 (rys. 39).



Rys. 39. Drzewo pokrewieństw izolatów wirusa Y ziemniaka, skonstruowane na podstawie analizy fragmentów restrykcyjnych powstałych po trawieniu nukleazą Hin6 I po zastosowaniu algorytmu UPGMA. Kolorami oznaczono przynależność do grup serologicznych: PVY^{NTN} – ■ i PVY^{NW} – ■

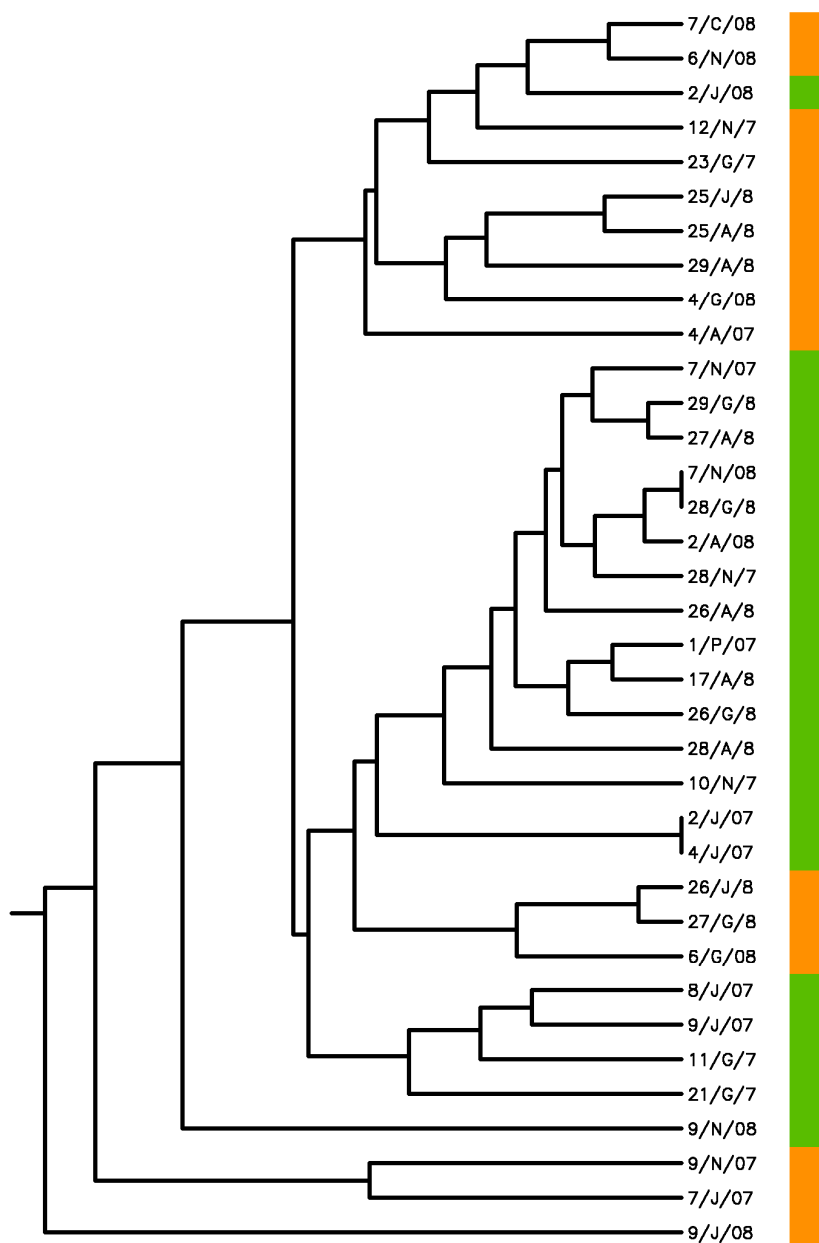
Zastosowanie algorytmu Neighbor-joining (N-J) w znaczący sposób wpłynęło na odmienne grupowanie poszczególnych izolatów. W tym przypadku nie można wyróżnić 2 głównych klastrow obejmujących odpowiednio izolaty z grupy PVY^{NTN} i PVY^{NW}. Zachowane jest jednak ogólne grupowanie do odpowiednich serotypów. W górnej części drzewa widać wyraźnie przewagę izolatów z grupy PVY^{NTN}, zaś w dolnej jego części przewagę izolatów PVY^{NW} (rys. 40). Obserwowane w poprzednim drzewie filogenetycznym izolaty o odmiennych właściwościach serologicznych w stosunku do pozostałych izolatów w danym klastrze również tutaj powodowały zaburzenia w zgodności układu dendrogramu z właściwościami serologicznymi, z tym, że tutaj grupa ta została powiększona o izolat 26/A/08.



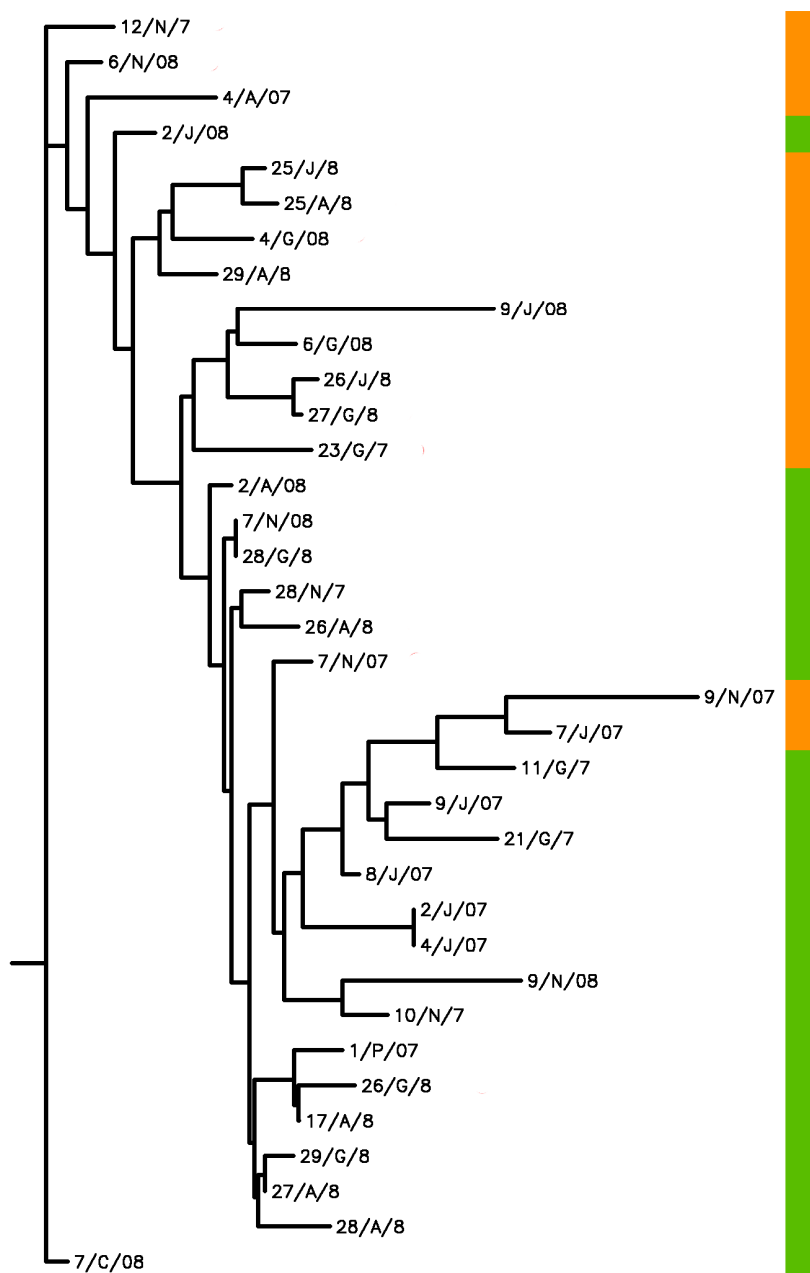
Rys. 40. Drzewo pokrewieństw izolatów wirusa Y ziemniaka, skonstruowane na podstawie analizy fragmentów restrykcyjnych powstałych po trawieniu nukleazą Hin6 I po zastosowaniu algorytmu Neighbor-Joining. Kolorami oznaczono przynależność do grup serologicznych: PVY^{NTN} – ■ i PVY^{NW} – ■

4.4.5. Trawienie enzymem Hinf I

Uzyskane po trawieniu enzymem Hinf I drzewa filogenetyczne zarówno po zastosowaniu algorytmu UPGMA jak i Neighbor-Joining – nie pozwalały na przejrzysty podział izolatów na PVY^{NW} i PVY^{NTN}. Wprawdzie widać grupowanie tych izolatów w większe bloki, ale nie są tworzone 2 wyraźne klastry (rys. 41,42).



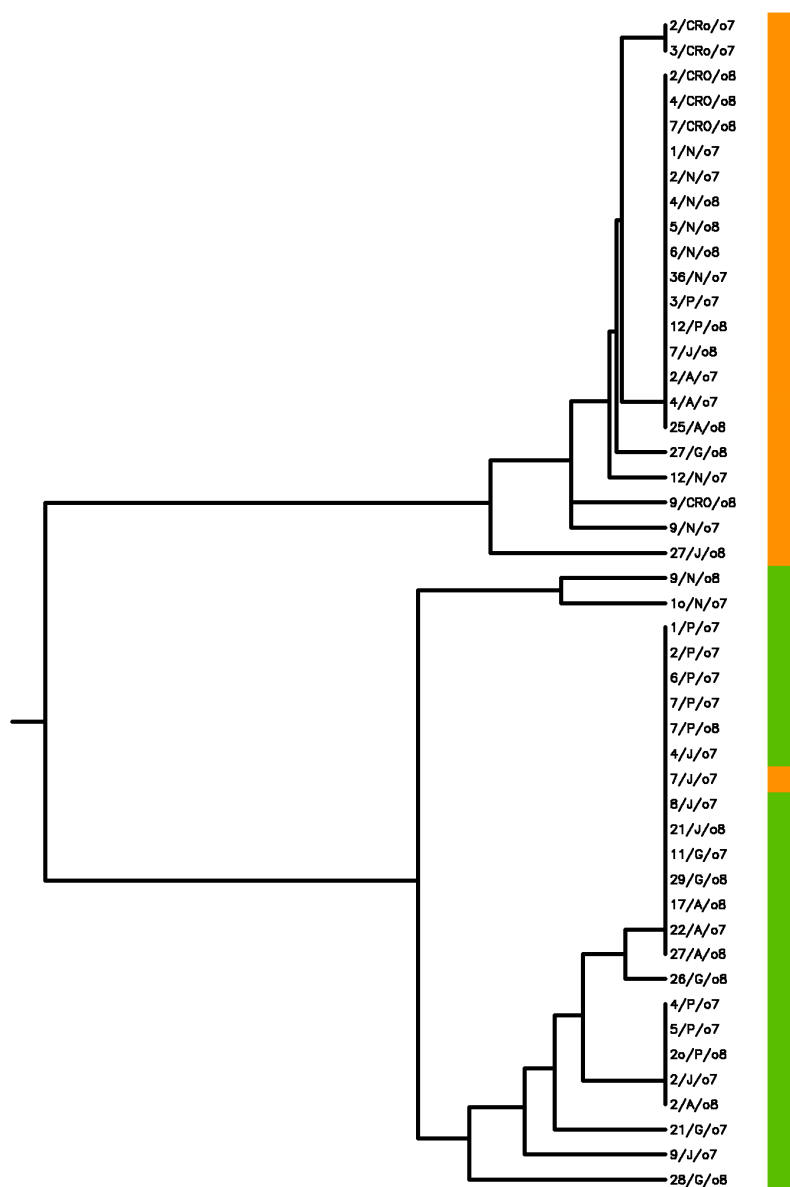
Rys. 41. Drzewo pokrewieństw izolatów wirusa Y ziemniaka, skonstruowane na podstawie analizy fragmentów restrykcyjnych powstałych po trawieniu nukleazą Hinf I po zastosowaniu algorytmu UPGMA. Kolorami oznaczono przynależność do grup serologicznych: PVY^{NTN} – ■ i PVY^{NW} – ■



Rys. 42. Drzewo pokrewieństw izolatów wirusa Y ziemniaka, skonstruowane na podstawie analizy fragmentów restrykcyjnych powstałych po trawieniu nukleazą Hinf I po zastosowaniu algorytmu Neighbor-Joining. Kolorami oznaczono przynależność do grup serologicznych: PVY^{NTN} – ■ i PVY^{NW} – ■

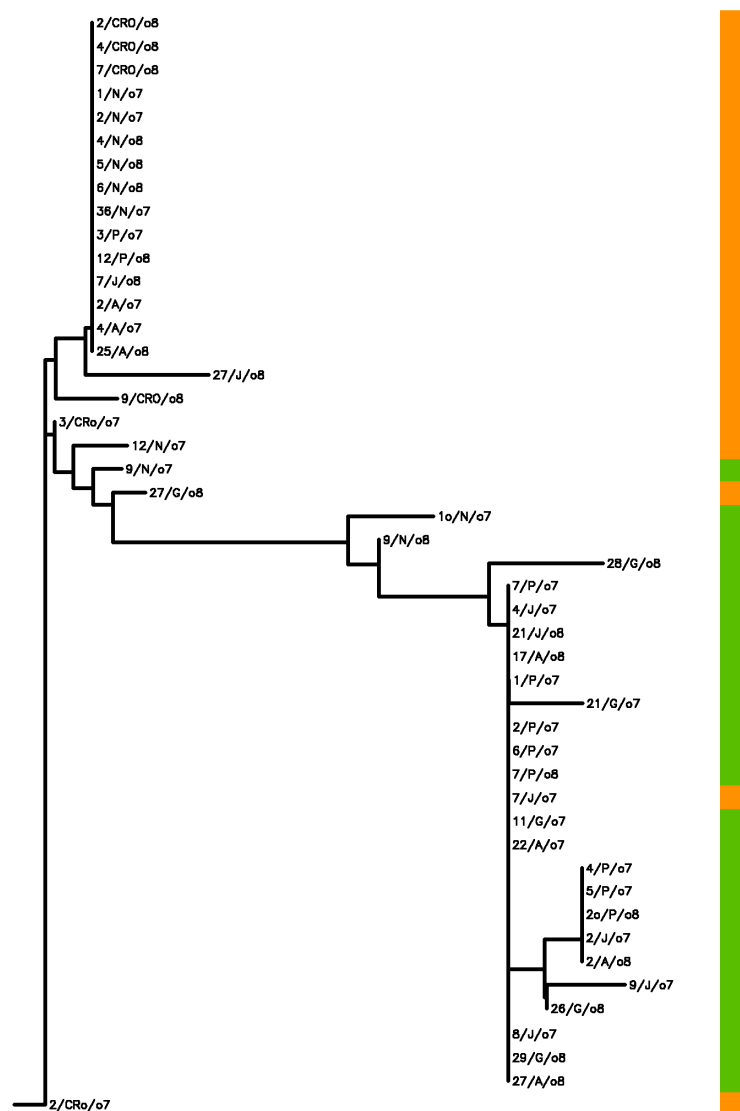
4.4.6. Trawienie enzymem Sdu I

Zastosowanie enzymu Sdu I i użycie algorytmu UPGMA do generowania drzewa filogenetycznego dało najlepsze rezultaty w odniesieniu do grupowania izolatów PVY na poszczególne serotypy. Otrzymano 2 główne klastry PVY^{NTN} i PVY^{NW}. Obserwowano tylko jeden izolat – 7/J/07 wykazujący odmienne właściwości serologiczne w stosunku do pozostałych izolatów w klastrze PVY^{NW} (rys. 43).



Rys. 43. Drzewo pokrewieństw izolatów wirusa Y ziemniaka, skonstruowane na podstawie analizy fragmentów restrykcyjnych powstałych po trawieniu nukleazą Sdu I po zastosowaniu algorytmu UPGMA. Kolorami oznaczono przynależność do grup serologicznych: PVY^{NTN} – ■ i PVY^{NW} – ■

Na podstawie wzorów restrykcyjnych otrzymanych po zastosowaniu endonukleazy Sdu I i algorytmu Neighbor-joining do generowania drzewa filogenetycznego badane izolaty podzielono na 2 główne klastry oraz 1 izolat o odmiennym wzorze restrykcyjnym – 2/Cro/07. Pierwszy klaster zawierał wyłącznie izolaty z grupy PVY^{NTN}. Drugi klaster w przeważającej większości obejmujący izolaty PVY^{NW}, zawierał również dwa izolaty należące do PVY^{NTN} – 9/N/07 i 7/J/07. Warto zauważyć, że obserwowano identyczne wzory restrykcyjne u izolatów pochodzących z różnych rejonów Polski i świata (rys. 44).



Rys. 44. Drzewo pokrewieństw izolatów wirusa Y ziemniaka, skonstruowane na podstawie analizy fragmentów restrykcyjnych powstałych po trawieniu nukleazą Sdu I po zastosowaniu algorytmu Neighbor-Joining. Kolorami oznaczono przynależność do grup serologicznych: PVY^{NTN} – ■ i PVY^{NW} – ■

4.4.7. Uzyskanie i analiza pełnej sekwencji nukleotydowej wybranych izolatów PVY

W celu identyfikacji determinantów warunkujących grupowanie izolatów do PVY^{NW} i PVY^{NTN} oraz identyfikacji determinantów odpowiedzialnych za przełamywanie odporności odmiany VAM i Wiślica przeprowadzono sekwencjonowanie cDNA piętnastu izolatów PVY (tab. 5). Wyboru izolatów do sekwencjonowania dokonano na podstawie charakterystyki serologicznej i zdolności poszczególnych izolatów do przełamywania odporności tytoniu. Izolację RNA oraz odwrotną transkrypcję RNA wykonano w IUNG-PIB, zaś właściwe sekwencjonowanie wykonano w firmie Genomed Sp. z o.o. Otrzymane pełne sekwencje wyrównano w programie ClustalX (Thompson i in., 1997), wraz z sekwencją izolatu referencyjnego zamieszczonego w GenBanku (numer akcesyjny NC_001616). Dalsze analizy pełnych wyrównanych sekwencji genomu wirusa analizowano odcinkami kodującymi poszczególne białka wirusowe. W tym celu w programie MEGA 4.1. na podstawie sekwencji nukleotydowych wydedukowano sekwencje aminokwasowe białek poszczególnych izolatów.

Tabela 5. Wykaz izolatów PVY poddanych sekwencjonowaniu

Nazwa sekwencji	Izolat*	Numer akcesyjny**	Serotyp	Genotyp
PVY 1	1/Cro/08	JF927749	PVY ^{NTN}	PVY ^{NTN}
PVY 2	7.K326/N/07	JF927750	PVY ^O	PVY ^{NW}
PVY 3	7.BPAzg/P/08	JF927751	PVY ^O	PVY ^{NW}
PVY 4	7.VSCR/J/08	JF927752	PVY ^{NTN}	PVY ^{NTN}
PVY 5	9.Hb92/I/07	JF927753	PVY ^O	PVY ^{NW}
PVY 6	10.VSCR/N/07	JF927754	PVY ^O	PVY ^{NW}
PVY 7	11.K326/G/07	JF927755	PVY ^O	PVY ^{NW}
PVY 8	12.HYB21/N/07	JF927756	PVY ^O	PVY ^{NTN}
PVY 9	4.Ky17/P/08	JF927757	PVY ^O	PVY ^{NTN}
PVY 10	21.K326/G/07	JF927758	PVY ^O	PVY ^{NW}
PVY 11	23.TN86/G/07	JF927759	PVY ^{NTN}	PVY ^{NTN}
PVY 12	26.VSCR/G/08	JF927760	PVY ^O	PVY ^{NW}
PVY 13	27.Wiślica/J/08	JF927761	PVY ^{NTN}	PVY ^{NTN}
PVY 14	28.VSCR/A/08	JF927762	PVY ^O	PVY ^{NW}
PVY 15	29.VRG2/A/08	JF927763	PVY ^{NTN}	PVY ^{NTN}

* wyjaśnienie nazwy poszczególnych izolatów zamieszczono w rozdziale 3.3.

** numer akcesyjny nadany przez GenBank

4.4.7.6. Zmienność sekwencji aminokwasowej białka CI

Białko CI jest największym białkiem kodowanym przez genom wirusa Y ziemniaka. Zbudowane jest z 634 aminokwasów. Jego sekwencja jest bardzo silnie konserwowana. Mutacje są bardzo nieliczne (rys. 50). Aminokwas w pozycji 15 decyduje o przynależności do jednego z dwóch serotypów: PVY^{NW} lub PVY^{NTN}. Isoleucyna (I) występuje w pierwszym z nich, a treonina (T) w drugim. Mutację występującą u wszystkich badanych izolatów w stosunku do izolatu referencyjnego stwierdzono jeszcze w pozycji 381, gdzie u izolatów badanych występowała isoleucyna (I), zaś u izolatu referencyjnego walina (V). Dodatkowo stwierdzono dwie mutacje punktowe w pozycjach 169 i 226 w sekwencji izolatu PVY 10.

gi 9627728	SLDDVIKNFDERNE	I	DFELSEDTIR	TSSVLDTKFS	SDWDRQIQMGHTLPHYRTEGHFME	[60]
PVY 1	.	T	.	.	.	[60]
PVY 2	[60]
PVY 3	[60]
PVY 4	.	T	.	.	.	[60]
PVY 5	[60]
PVY 6	[60]
PVY 7	[60]
PVY 8	.	T	.	.	.	[60]
PVY 9	.	T	.	.	.	[60]
PVY 10	[60]
PVY 11	.	T	.	.	.	[60]
PVY 12	[60]
PVY 13	.	T	.	.	.	[60]
PVY 14	[60]
PVY 15	.	T	.	.	.	[60]
gi 9627728	FTRATAVQVANDI	AHSEHLDFLVRGAVGSGKSTGL	PVHLSVAGSVLLI	EPTRPLAENVFK		[120]
PVY 1	[120]
PVY 2	[120]
PVY 3	[120]
PVY 4	[120]
PVY 5	[120]
PVY 6	[120]
PVY 7	[120]
PVY 8	[120]
PVY 9	[120]
PVY 10	[120]
PVY 11	[120]
PVY 12	[120]
PVY 13	[120]
PVY 14	[120]
PVY 15	[120]
gi 9627728	QLSSEPF FKKPTLRMRGNSI	FGSSPISVMTSGFALHYFANNRS	QLAQFN	FVIFDECHVLD		[180]
PVY 1	[180]
PVY 2	[180]
PVY 3	[180]
PVY 4	[180]
PVY 5	[180]
PVY 6	[180]
PVY 7	[180]
PVY 8	[180]
PVY 9	[180]
PVY 10	.	.	.	S	.	[180]
PVY 11	[180]
PVY 12	[180]
PVY 13	[180]
PVY 14	[180]
PVY 15	[180]

gi|9627728 PSAMAFRSLLSVYHQACKVLKVSATPVGREVEFTTQQPVKLI VED T LSFQSFVDAQGSKT [240]
 PVY 1 [240]
 PVY 2 [240]
 PVY 3 [240]
 PVY 4 [240]
 PVY 5 [240]
 PVY 6 [240]
 PVY 7 [240]
 PVY 8 [240]
 PVY 9 [240]
 PVY 10 S [240]
 PVY 11 [240]
 PVY 12 [240]
 PVY 13 [240]
 PVY 14 [240]
 PVY 15 [240]

gi|9627728 NADVQFGSNVLVYVSSYNEVDTLAKLLTDKNMMVTKVDGRMKHGCLEIVTKGTSARPH [300]
 PVY 1 [300]
 PVY 2 [300]
 PVY 3 [300]
 PVY 4 [300]
 PVY 5 [300]
 PVY 6 [300]
 PVY 7 [300]
 PVY 8 [300]
 PVY 9 [300]
 PVY 10 [300]
 PVY 11 [300]
 PVY 12 [300]
 PVY 13 [300]
 PVY 14 [300]
 PVY 15 [300]

gi|9627728 FVVATNIENGVTLDIDVVDFGLKVSPFLDINRSIAYNKVSVSYGERIQRLGRVGRFK [360]
 PVY 1 [360]
 PVY 2 [360]
 PVY 3 [360]
 PVY 4 [360]
 PVY 5 [360]
 PVY 6 [360]
 PVY 7 [360]
 PVY 8 [360]
 PVY 9 [360]
 PVY 10 [360]
 PVY 11 [360]
 PVY 12 [360]
 PVY 13 [360]
 PVY 14 [360]
 PVY 15 [360]

gi|9627728 KGVALRIGHTEKGIIEIPSMVAATEAALACFAYNLPVMTGGVSTSLIGNCTVRQVKTMQQF [420]
 PVY 1 [420]
 PVY 2 [420]
 PVY 3 [420]
 PVY 4 [420]
 PVY 5 [420]
 PVY 6 [420]
 PVY 7 [420]
 PVY 8 [420]
 PVY 9 [420]
 PVY 10 [420]
 PVY 11 [420]
 PVY 12 [420]
 PVY 13 [420]
 PVY 14 [420]
 PVY 15 [420]

gi|9627728 ELSPPFIQNFVAHDGSMHPVIHDI LKKYKLRDCMTPLCDQSI PYRASSTWLSVSEYERLG [480]
 PVY 1 [480]
 PVY 2 [480]
 PVY 3 [480]
 PVY 4 [480]
 PVY 5 [480]
 PVY 6 [480]
 PVY 7 [480]
 PVY 8 [480]
 PVY 9 [480]
 PVY 10 [480]
 PVY 11 [480]
 PVY 12 [480]
 PVY 13 [480]
 PVY 14 [480]
 PVY 15 [480]

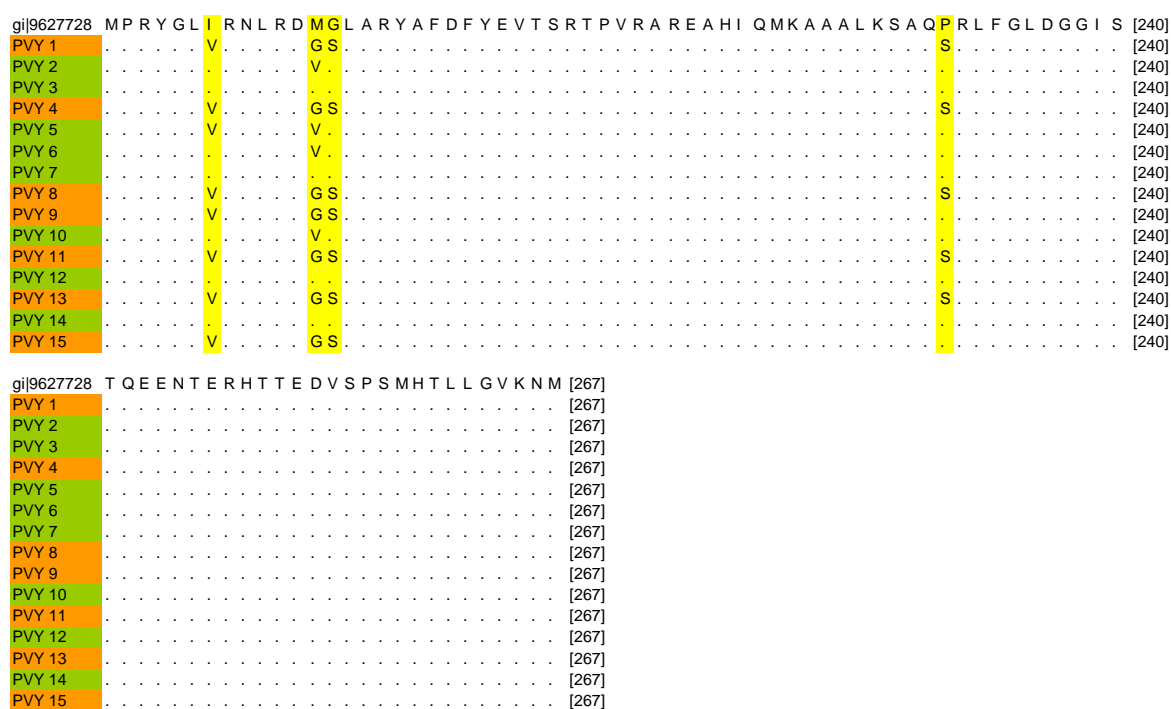
gi 9627728	V A L E I P K Q V K I A F H I K E I P P K L H E M L W E T V V K Y K D V C L F P S I R A S S I S K I A Y T L R T D L F A	[540]
PVY 1	.	[540]
PVY 2	.	[540]
PVY 3	.	[540]
PVY 4	.	[540]
PVY 5	.	[540]
PVY 6	.	[540]
PVY 7	.	[540]
PVY 8	.	[540]
PVY 9	.	[540]
PVY 10	.	[540]
PVY 11	.	[540]
PVY 12	.	[540]
PVY 13	.	[540]
PVY 14	.	[540]
PVY 15	.	[540]
gi 9627728	I P R T L I L V E R L L E E E R V K Q S Q F R S L I D E G C S S M F S I V N L T N T L R A R Y A K D Y T A E N I Q K L E	[600]
PVY 1	.	[600]
PVY 2	.	[600]
PVY 3	.	[600]
PVY 4	.	[600]
PVY 5	.	[600]
PVY 6	.	[600]
PVY 7	.	[600]
PVY 8	.	[600]
PVY 9	.	[600]
PVY 10	.	[600]
PVY 11	.	[600]
PVY 12	.	[600]
PVY 13	.	[600]
PVY 14	.	[600]
PVY 15	.	[600]
gi 9627728	K V R S Q L K E F S N L D G S A C E E N L I K R Y E S L Q F V H H Q	[634]
PVY 1	.	[634]
PVY 2	.	[634]
PVY 3	.	[634]
PVY 4	.	[634]
PVY 5	.	[634]
PVY 6	.	[634]
PVY 7	.	[634]
PVY 8	.	[634]
PVY 9	.	[634]
PVY 10	.	[634]
PVY 11	.	[634]
PVY 12	.	[634]
PVY 13	.	[634]
PVY 14	.	[634]
PVY 15	.	[634]

Rys. 50. Sekwencja aminokwasowa białka CI. Kolorami oznaczono przynależność do grup serologicznych:

PVY^{NTN} – ■ i PVY^{NW} – ■

4.4.7.7. Zmienność sekwencji aminokwasowej białka 6K2

Zbudowane z 52 aminokwasów – białko 6K2, to jedno z dwóch najmniejszych białek wirusa, obok białka 6K1. Stwierdzono dwie mutacje we wszystkich badanych izolatach w stosunku do izolatau referencyjnego w pozycjach 14 – z izoleucyny (I) na treoninę (T) i 16 – z asparaginy (N) na lizynę (K) (rys. 51).



Rys. 54. Sekwencja aminokwasowa białka CP. Kolorami oznaczono przynależność do grup serologicznych: PVY^{NTN} – ■ i PVY^{NW} – ■

4.4.8. Położenie filogenetyczne zsekwencjonowanych izolatów PVY na tle pełnych sekwencji genomowych PVY umieszczonych w GenBanku

Badane izolaty porównano z 81 pełnymi sekwencjami nukleotydowymi zdeponowanymi w GenBanku (tab. 6). 17 izolatów należało do szczepu PVY^N, 13 do grupy PVY^{NW}, a 24 do PVY^{NTN}. Trzy izolaty zaklasyfikowane zostały do zaproponowanego przez syryjskich i japońskich badaczy nowego szczepu PVY^{NTN-NW} (Chikh i in., 2010). 10 izolatów należało do szczepu O, zaś do szczepu C - trzy. Ponadto do porównania użyto 1 izolat paprykowy należący do szczepu NNP, dwa izolaty tytoniowe jeden nazwany MN należący do szczepu MN i drugi Gr99 należący do szczepu PVY^{NTN} oraz 9 izolatów o nieokreślonej przynależności, co do szczepu. Pozyskane pełne sekwencje wirusa Y ziemniaka wyrównano w programie MEGA 4.1. przy pomocy algorytmu ClustalW z sekwencjami nukleotydowymi badanych 15 izolatów, po czym skonstruowano drzewa filogenetyczne metodą UPGMA oraz Neighbor-Joining (rys. 55 i 56). Zastosowano test poprawności bootstrap dla 1000 powtórzeń tworzenia dendrogramów.

Niezależnie od użytego do analizy 96 sekwencji genomowych PVY algorytmu, zarówno po zastosowaniu algorytmu UPGMA jak i Neighbor-Joining wyróżniono 5 klastrow. Do pierwszego klastra – PVY^{NW} zakwalifikowano wszystkie badane przez autora izolaty należące do PVY^{NW}. Jednorodny charakter tego klastra zaburza izolat LW uznany na

podstawie charakteru biologicznego za należący do szczepu PVY^O oraz izolat SASA 207 określony jako PVY^N. Do drugiego klastra zaliczono izolaty należące do szczepu PVY^O, ale również izolat Wilga uznany za należący do grupy PVY^{NW}. Przy czym należy nadmienić, że sekwencja tego izolatu została pozyskana z izolatu, który przez okres 30 lat był pasażowany w warunkach laboratoryjnych. Na uwagę zasługuje również grupa 5 izolatów: N-Egypt, gi492885, izolat referencyjny gi 9627728, gi61450 i gi441193, które zaklasyfikowano do szczepu nekrotycznego, ale po analizie filogenetycznej na dendrogramie tworzą wydzieloną podgrupę, w obrębie klastra PVY^O, bardziej spokrewnioną z izolatami z klastra PVY^O, niż z izolatami z klastra PVY^{N/NTN}, czy PVY^{NTN}. Najbardziej liczny klastery to PVY^{NTN}. W jego skład weszły wszystkie badane izolaty, które na wcześniejszych etapach badań serologicznych zostały uznane za PVY^{NTN}. Ponadto znalazł się tu również niemiecki izolat Wilga 156. Czwarty klastery PVY^{N/NTN} budują izolaty należące do szczepu PVY^N oraz 3 izolaty japońskie i jeden niemiecki wykazujące cechy biologiczne charakterystyczne dla PVY^{NTN}. Ponadto w skład tego klastra wchodzi również 1 izolat wykazujący cechy biologiczne PVY^O – SASA-61. Ostatni najmniej liczny, bo składający się tylko z 3 izolatów klastery, to PVY^C. Do analizy filogenetycznej włączono również izolaty PVY pozyskane z pomidorów lub papryki jak np. Chile 3 (Moury B., 2010), który jest najbardziej ewolucyjnie odległym izolatem w stosunku do pozostałych. Jego stopień homologii do izolatu PVY 2 wynosi zaledwie 83,7%.

W obrębie poszczególnych klastrów, porównywano stopień podobieństwa badanych izolatów z sekwencjami zdeponowanymi w GenBanku. Spośród badanych izolatów, najbardziej zbliżony do izolatu Wilga był PVY 7. Podobieństwo sekwencji wynosiło 94,7%. Niemiecki izolat Wilga 5 wykazywał 99,2% homologii z PVY 5 – a izolat Wilga 261-4 – 98,9% podobieństwa z badanym PVY 7. Nieco bardziej odległe filogenetycznie od badanych izolatów były niemieckie Wilga 156 i Wilga 156var oraz polski LW. Najbardziej zbliżoną sekwencję do dwóch pierwszych izolatów posiadał PVY 6 odpowiednio – 94,7% i 97,8% podobieństwa, natomiast największy stopień homologii w stosunku do izolatu LW spośród badanych izolatów wykazywał PVY 5 – 98,6%.

W obrębie klastra PVY^{NTN} najbardziej zbliżonym pod względem podobieństwa sekwencji nukleotydowej do izolatów umieszczonych w GenBanku był PVY 15, który wykazywał 99,8% podobieństwa w stosunku do izolatu v942490. Nieco mniejsze podobieństwa wykazywał izolat PVY 4 w stosunku do gi116664524 i węgierskiego izolatu Hungarian i wynosiły one odpowiednio 99,7% i 99,6%. Spośród badanych izolatów największy stopień homologii w stosunku do niemieckiego izolatu Satina ujawniał PVY 15 i

wynosił on 99,6%. Największe podobieństwo do polskich izolatów Gr99 (pozyskany w 1999 roku z tytoniu w Grudziądzu) i Nysa wykazywał PVY 4 – odpowiednio 97,2% i 98%. W stosunku do izolatów syryjskich badane izolaty wykazywały identyczność sekwencji w zakresie od 96,8% do 97,3%. Biorąc pod uwagę izolaty chińskie stopień homologii w stosunku do badanych izolatów zawierał się w granicach od 97,6% do 98,1%. Stopień homologii badanych izolatów w odniesieniu do izolatów północno-amerykańskich wynosił od 99,4% do 99,8%. Znacznie mniejszy stopień homologii obserwowano w stosunku do japońskich izolatów i wynosił on 91,2%. Izolaty japońskie wywołujące nekrozy na bulwach ziemniaka (Ogawa i in., 2008) z uwagi na duże pokrewieństwo sekwencji nukleotydowej ich genomu z izolatami należącymi do szczepu PVY^N, podczas konstruowania drzewa filogenetycznego zaklasyfikowano do klastra PVY^{N/NTN}, a nie PVY^{NTN}.

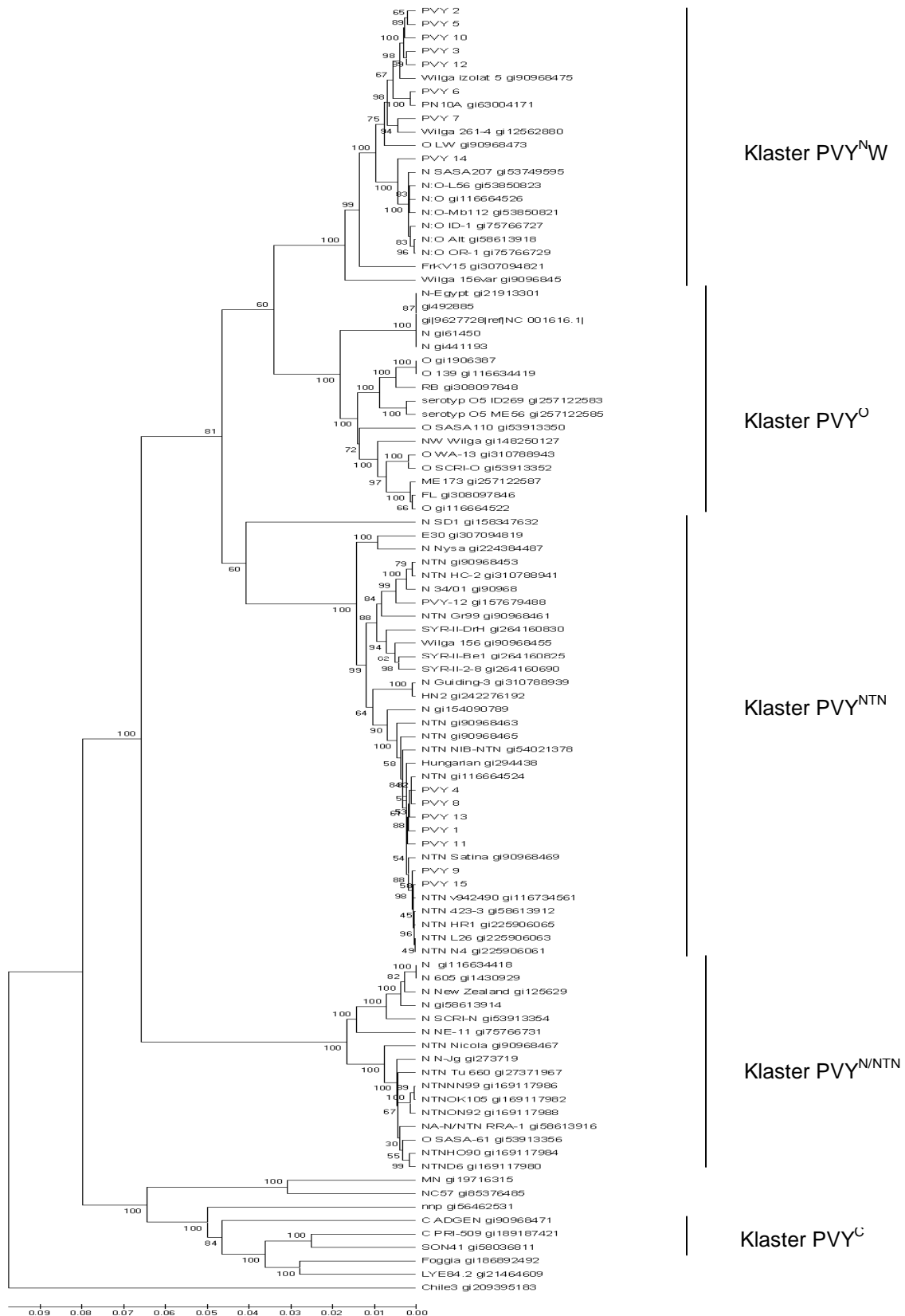
Tabela. 6. Wykaz izolatów wirusa Y ziemniaka zdeponowanych w GenBanku, których sekwencje nukleotydowe wykorzystano do porównania z badanymi izolatami

L.p.	Izolat	Szczep	Nr akcesyjny	GI (wersja genomu)	Kraj pochodzenia
1	N-Egypt	PVY ^N	AF522296	21913301	Egipt
2	SASA 207		AJ584851	53749595	Wielka Brytania
3	SCRI-N		AJ585197	53913354	Wielka Brytania
4	PVY-12		AB185833	157679488	Syria
5	-		AB270705	154090789	Syria
6	34/01		AJ890342	90968459	Polska
7	New Zeland		AM268435	125629024	Nowa Zelandia
8	N-Jg		AY166867	27371969	Kanada
9	Mont		AY884983	58613914	USA
10	Sequence 1		CS434575	116634418	Francja
11	PVYn		D00441	441193	Francja
12	NE-11		DQ157180	75766731	USA
13	SD 1		EU182576	158347632	Chiny
14	Nysa		FJ666337	224384487	Polska
15	Guiding-3		HM590405	310788939	Chiny
16	-		X12456	61450	Francja
17	PVY ^N 605		X97895	1430929	Szwajcaria
18	Wilga 156	PVY ^{NW}	AJ889867	90968455	Niemcy
19	Wilga 156 var		AJ889868	90968457	Niemcy
20	Wilga 5		AJ890350	90968475	Niemcy
21	261-4		AM113988	125628801	Niemcy
22	Mb-112		AY745491	53850821	Kanada

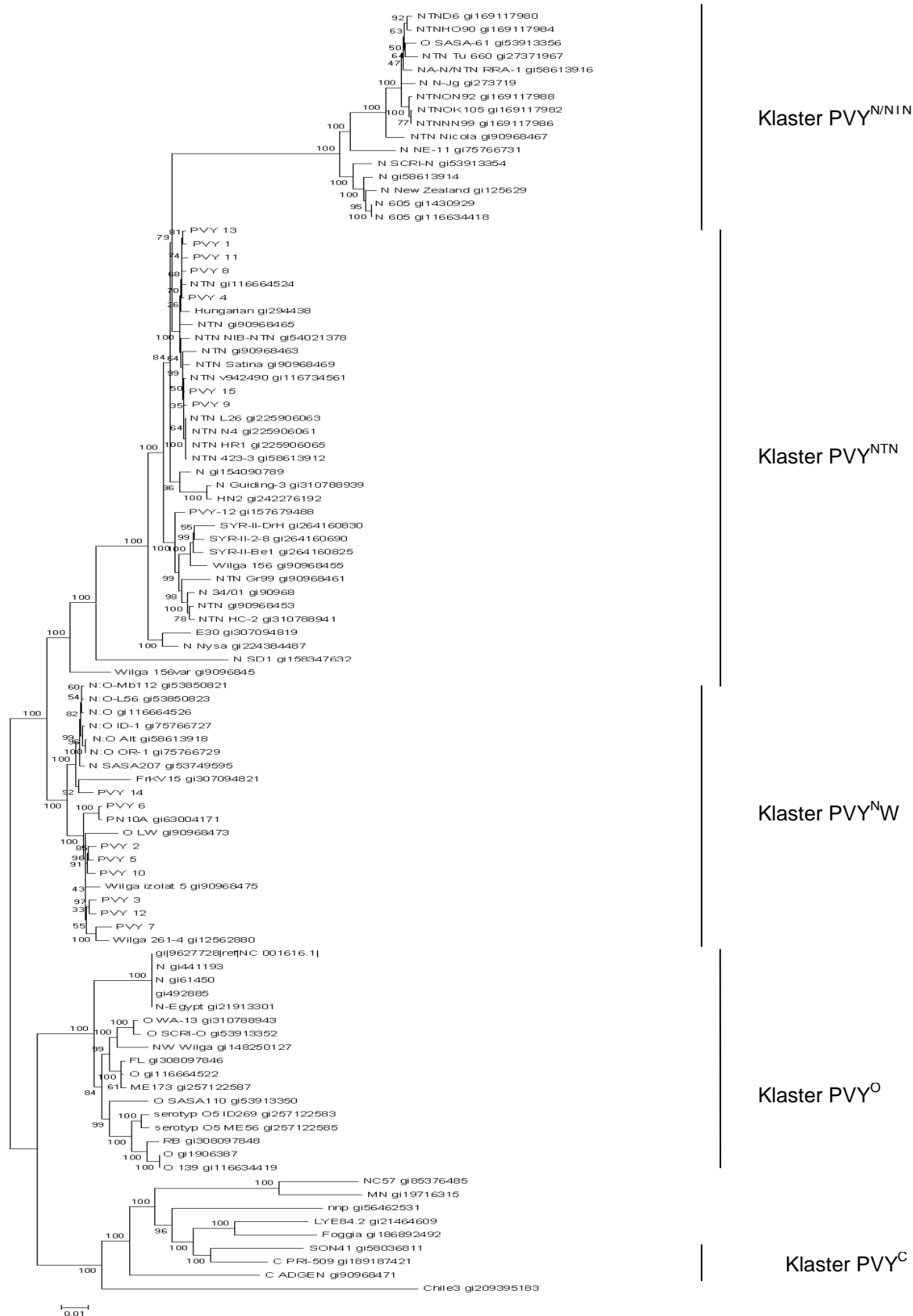
23	L 56		AY745492	53850823	Kanada
24	Alt		AY884985	58613918	USA
25	ID-1		DQ157178	75766727	USA
26	OR-1		DQ157179	75766729	USA
27	-		EF026076	116665526	USA
28	Wilga (30-lat)		EF558545	148250127	Polska
29	FrKV15		HM991454	307094821	Francja
30	ref		NC_001616	9627728	Francja
31	NTND6	PVY ^{NTN}	AB331515	169117980	Japonia
32	NTNOK105		AB331516	169117982	Japonia
33	NTNH090		AB331517	169117984	Japonia
34	NTNNN99		AB331518	169117986	Japonia
35	NTNON92		AB331519	169117988	Japonia
36	NIB-NTN		AJ585342	54021378	Słowenia
37	-		AJ889866	90968453	Polska
38	Gr99		AJ890343	90968461	Polska
39	Ditta		AJ890344	90968463	Polska
40	Linda		AJ890345	90969465	Niemcy
41	Nicola		AJ890346	90968467	Niemcy
42	Satina		AJ890347	90968469	Niemcy
43	Tu 660		AY166866	27371967	Kanada
45	423-3		AY884982	58613912	USA
46	v942490		EF016294	116734561	Wielka Brytania
47	-		EF026075	116664524	USA
48	N4		FJ204164	225906061	USA
49	L 26		FJ204165	225906063	USA
50	HR 1		FJ204166	225906065	USA
51	HN2		GQ200836	242276192	Chiny
52	HC-2		HM590406	310788941	Chiny
53	E 30		HM991453	307094819	Polska
54	Hungarian		M95491	294438	Węgry
55	RRA-1		AY884984	58613916	USA
56	SYR-II-2-8	PVY ^{NTN-NW}	AB461451	264160690	Syria
57	SYR-II-Bel		AB461452	264160825	Syria
58	SYR-II-DrH		AB461453	264160830	Syria
59	SASA 110	O	AJ585195	53913350	Wielka Brytania
60	SCRI-O		AJ585196	53913352	Wielka Brytania
61	SASA 61		AJ585198	53913356	Wielka Brytania
62	LW		AJ890349	90968473	Polska

63	PVY ⁰ 139		CS434577	116634419	Francja
64	-		EF026074	116664522	USA
65	FL		HM367075	308097846	Kanada
66	RB		HM367076	308097848	Kanada
67	WA-13		HM590407	310788943	Chiny
68	-		U09509	1906387	Kanada
69	SON41		AJ439544	58036811	Francja
70	Adgen	C	AJ890348	90968471	Francja
71	PRI-509		EU563512	189187421	Holandia
72	Nnp	NNP	AF237963	564625531	Włochy
73	MN	MN	AF463399	19716315	USA
74	LYE 84.2	b.d.*	AJ439545	21464609	Hiszpania
75	PN10A	b.d.	DQ008213	63004171	USA
76	NC57	b.d.	DQ309028	85376485	USA
77	Foggia	b.d.	EU482153	186892492	Włochy
78	Chile3	b.d.	FJ214726	209395183	Chile
79	ID 269	b.d.	FJ643477	257122583	USA
80	ME 56	b.d.	FJ643478	257122585	USA
81	ME 173	b.d.	FJ643479	257122587	USA
82	-	b.d.	A08776	492885	Francja

* brak danych



Rys. 55. Drzewo filogenetyczne skonstruowane przy wykorzystaniu algorytmu UPGMA na podstawie porównania całkowitych sekwencji nukleotydowych izolatów PVY zdeponowanych w GenBanku



Rys. 56. Drzewo filogenetyczne skonstruowane przy wykorzystaniu algorytmu N-J na podstawie porównania całkowitych sekwencji nukleotydowych izolatów PVY zdeponowanych w GenBanku

4.4.9. Zdarzenia rekombinacyjne w genomie PVY

W celu wykrycia zdarzeń rekombinacyjnych, badane izolaty porównano z dostępnymi, pełnymi sekwencjami genomowymi wirusa zamieszczonymi w Genbanku. Do analiz użyto programu RDP v.3.34 i wykorzystano algorytmy RDP (Martin D. i Rybicki E., 2000) i SiScan (Gibbs i in., 2000). Wynikiem końcowym analiz są schematyczne mapy genomowe, przedstawiające w graficzny sposób miejsca rekombinacji oraz wskazujące izolaty rodzicielskie, z których pochodzi zrekombinowany fragment. (rys. 57).

Przetasowania w sekwencjach genomowych obserwowano u 95 izolatów. Liczba miejsc rekombinacji wśród tych izolatów wahała się od dwóch np. Foggia do nawet 9 miejsc w przypadku izolatu Gr 99. Jedynie w przypadku 2 izolatów należących do szczepu PVY^C: Adgen i Chile 3 nie stwierdzono zjawiska rekombinacji. Biorąc pod uwagę przynależność poszczególnych izolatów do odpowiednich klastrow widocznych na rys. 55 i 56, to izolaty z klastra PVY^O zawsze posiadały 2 miejsca rekombinacji. Izolaty z klastra PVY^{NW} najczęściej posiadały 3 lub 4 miejsca rekombinacji, jedynie 2 izolaty: PN10A i Wilga 156var wykazywały odpowiednio 6 i 7 takich miejsc. Izolaty: N-Egipt, gi492885, izolat referencyjny gi 9627728, gi61450 i gi441193, których po analizie filogenetycznej nie udało się przyporządkować do żadnego z klastrow, posiadały zawsze po 6 miejsc rekombinacji. Wśród izolatów zaliczonych do klastra PVY^{N/NTN} najczęściej obserwowano 4 miejsca rekombinacji genomu wirusa, bo aż w 9 przypadkach, po 2 miejsca rekombinacji u 5 izolatów i tylko jeden izolat – SCRI-N wykazywał 6 miejsc rekombinacji. Izolatami charakteryzującymi się najczęstszymi rekombinacjami były te z klastra PVY^{NTN}, w szczególności izolat Gr 99, który posiadał aż 9 miejsc rekombinacji. Genomy czterech izolatów: Nysa, E30, Syr-II-DH i gi90968463 posiadały po 7 miejsc rekombinacji, a osiem innych izolatów po 6 takich miejsc. Największą grupę izolatów – 17, stanowiły te, w których genomach stwierdzono po 5 miejsc rekombinacji. W obrębie klastra PVY^{NTN}, tylko 2 izolaty posiadały po 2 miejsca rekombinacji. Pozostałe izolaty, odległe filogenetycznie i nie tworzące żadnego klastra, wykazywały najczęściej 2 miejsca rekombinacji, z wyjątkiem wyżej wspomnianych Adgen i Chile3, które nie uległy rekombinacji oraz izolat NC57, u którego stwierdzono aż 6 takich pozycji.

Wśród piętnastu badanych izolatów PVY 1 do PVY 15, wszystkie zarówno PVY^{NW} i PVY^{NTN}, posiadały zrekombinowany fragment genomu pochodzący od izolatu New Zeland. Różnica między nimi polegała jednak na tym, że wśród izolatów PVY^{NTN} fragment ten obejmował cały 5' koniec genomu włączając w to geny kodujące białko P1, HC-Pro i niewielki fragment P3, podczas gdy u izolatów PVY^{NW} fragment ten był mniejszy i

obejmował około połowy genu kodującego białko P1 i całe HC-Pro. Wyjątkiem jest tu izolat PVY 14, który pomimo przynależności do grupy PVY^{NW} posiadał fragment pochodzący od New Zeland, taki jak u izolatów PVY^{NTN}. Sekwencja aminokwasowa białka P1 jest tu identyczna jak u pozostałych badanych izolatów PVY^{NTN}. Ponieważ izolat ten powodował bardzo silne nekrozy na tytoniu przypuszcza się, że mogły one wynikać właśnie z charakteru białka P1. Analiza programem RDP wśród badanych izolatów PVY^{NW} wykazała również zrekombinowany fragment w pobliżu końca 5' genomu, pochodzący od izolatu SASA 110 (szczep O). Ponadto wszystkie izolaty PVY^{NTN} posiadały fragment genomu pochodzący od szwajcarskiego izolatu N 605. Fragment ten obejmował niemal cały gen kodujący białko VPg, NIa-Pro, NIb i prawie cały gen białka płaszczka. To tłumaczy, dlaczego te izolaty w testach serologicznych były wykrywane przez przeciwciała monoklonalne anty-N, podczas gdy izolaty z grupy PVY^{NW} – nie posiadające zrekombinowanego fragmentu pochodzącego od N 605 – nie były wykrywane.



Rys. 57. Wizualizacja zmian w sekwencji nukleotydydowej genomów badanych i zdeponowanych w GenBanku izolatów PVY

Objaśnienia: Nazwa izolatu znajduje się nad górnym lewym rogiem prostokąta schematycznie przedstawiającego genom każdego z izolatów. Sekwencje nabyte w drodze rekombinacji oznaczono mniejszymi prostokątami o odmiennej barwie umieszczonych pod głównym prostokąt. Po prawej stronie tych prostokątów podano nazwy izolatów, z których te sekwencje pochodzą. Jako „unknown” określono sekwencje, których nie odnaleziono wśród wszystkich użytych w analizie

5. Dyskusja

5.1. Występowanie wirusa Y ziemniaka w Polsce i na świecie

Biorąc pod uwagę wszystkie uwzględnione w badaniach odmiany podatne tytoniu, infekcje wirusem wystąpiły we wszystkich lokalizacjach w Polsce. Niezależnie od roku prowadzenia doświadczeń polowych najwyższe infekcje obserwowano w Jędrzejowie. W latach 2006-2008 w Puławach, Jędrzejowie i Grudziądzu z roku na rok procentowy udział zainfekowanych roślin z tej grupy wzrastał, osiągając nawet 97,1 %. Jedynie w Augustowie w 2007 r. dał się zauważyć spadek liczby infekcji w stosunku do roku poprzedniego – do poziomu 15,3 %. Rozpatrując poszczególne odmiany podatne należy zauważyć, że najbardziej infekowane były Kentucky 17 i Burley 21. W 2008 roku średnio na wszystkich polach doświadczalnych, zainfekowanych było odpowiednio 95,7 % oraz 92,2 % roślin tych odmian. Na podstawie raportów publikowanych przez CORESTA dotyczących zagrożeń ze strony PVY na świecie, w Niemczech, Chorwacji i we Francji w latach 2006-2008 podobnie jak w Polsce najbardziej infekowane były odmiany Burley 21 i Kentucky 17 (Doroszewska, 2010; CD ROM Version N^o 31). Odmiana K 326 najbardziej infekowana była w Szwajcarii, Kolumbii i Republice Południowej Afryki. W badanej przez autora grupie odmian odpornych procentowy udział zainfekowanych roślin był znacznie niższy niż w grupie odmian podatnych i nie przekraczał w Polsce 2 %. W trzech lokalizacjach: Jędrzejowie, Grudziądzu i Augustowie w latach 2006-2008 wzrastał procentowy udział zainfekowanych roślin, osiągając maksymalnie 1,9 % w 2008 roku w Jędrzejowie. Na polu doświadczalnym w Puławach infekcja odmian odpornych wystąpiła jedynie w roku 2007. Najczęściej infekowaną odmianą była Virginia SCR (VD). Największy procentowy udział roślin tej odmiany zainfekowanych przez PVY wystąpił w 2008 roku w Jędrzejowie i wynosił 5 %. Odmianą, która w okresie prowadzenia badań, w żadnej z lokalizacji nie uległa infekcji była VAM. Fakt braku jej zainfekowania nie oznacza całkowitej odporności tej odmiany, bowiem istnieją izolaty zdolne przełamywać jej odporność w warunkach szklarniowych. Porównując osiągnięte przez autora wyniki, do danych publikowanych przez CORESTA, warto zauważyć, że odmiana Virginia SCR jest najczęściej infekowaną odmianą odporną na świecie. O ile jednak w Polsce, największe porażenie wynosiło 5 %, to już w Niemczech osiągało blisko 70%, a w Zimbabwie nawet 80% w 2007 r. Jednocześnie odmiana VAM, która w Polsce w latach 2006-2008 nie uległa infekcji w Niemczech w 2008 r. porażana była w 18 %, a w Kolumbii nawet ponad 40%. Spośród krajów świata biorących udział w badaniach nad PVY w ramach Sub-Group Collaborative Study on Potato Virus Y, największe średnie infekcje

PVY za okres od 2003 do 2008 r. występowały w Niemczech (75 %) i w Szwajcarii (68 %), zaś trzecim w kolejności krajem była Polska (53 %), (Doroszevska, 2010; CD ROM Version N° 31)

Duże zróżnicowanie infekcji w zależności od roku i lokalizacji można tłumaczyć zmiennymi warunkami pogodowymi. Dzięki wieloletnim doświadczeniom prowadzonym przez Doroszevską (2008) nad PVY w Puławach, możliwe stało się przeprowadzenie analizy wpływu warunków pogodowych na porażenie tytoniu w poszczególnych latach. Wykazano, że długotrwałe utrzymywanie się wysokich temperatur, powyżej 20°C powodowało statystycznie istotnie mniejsze nasilenie tego zjawiska. Przykładem mogą być lata 2003, 2006 i 2010 (rys. 25), kiedy przy wysokiej temperaturze w okresie wegetacji obserwowano stosunkowo niskie porażenie roślin. Wysokie porażenie wirusem w latach 1996, 2004 i 2009 skorelowane było z niższą temperaturą w okresie letnim. Podobna sytuacja miała miejsce w Niemczech i Szwajcarii. W latach, kiedy w Polsce występowało małe nasilenie infekcji tytoniu przez wirusa Y ziemniaka, podobnie niskie infekcje obserwowano w Niemczech i Szwajcarii, a więc w krajach o zbliżonym do polskiego klimacie. Również w latach o wysokim nasileniu choroby w Polsce podobnie wysokie nasilenie choroby występowało w tych krajach (Doroszevska, 2010; CD ROM Version N° 31). Warto również dodać, że we Francji problem występowania PVY na tytoniu największy jest w północnej części kraju o umiarkowanym klimacie. Na południu kraju infekcje PVY nie stwarzają dużych problemów (Verrier J.L., 2001a). Wcześniej przypuszczano, że bardzo niskie temperatury w okresie zimowym mogą wpływać na zmniejszone porażenie roślin w sezonie wegetacyjnym, wynikające z gorszej przeżywalności mszyc - wektora PVY. Jednakże po przeprowadzonych analizach stwierdzono, że bardzo niskie temperatury w okresie zimowym nie miały istotnego wpływu na infekcje w okresie wegetacyjnym. Może to wynikać ze sposobu przenoszenia wirusa w sposób nietrwały na kłujce owada. Nawet niewielka liczba mszyc jest w stanie, w krótkim czasie, zainfekować dużą liczbę roślin. Wynika to z faktu, że czas potrzebny na zakażenie rośliny jest bardzo krótki – nawet kilka sekund (Feres i Collar, 2001; Pirone i Perry, 2002). Ponieważ wirus Y ziemniaka jest patogenem zarówno tytoniu jak i ziemniaka, a zatem duża powierzchnia upraw ziemniaka w danym rejonie produkcji tytoniu może wpływać na nasilenie choroby na tytoniu. Plantacje ziemniaka stanowią źródło infekcji upraw tytoniu zarówno jako miejsce żerowania i namnażania się mszyc, będących wektorami wirusa, i jako miejsce rozwoju samego patogena. Z powodu licznych populacji mszyc w głównych rejonach uprawy ziemniaka w Europie, plantacje sadzeniaków lokalizuje się w rejonach o niskiej presji infekcyjnej. Przykładem może być rejon Tyrnävä-Liminka w centralnej części Finlandii

(64°46'N), zatwierdzony przez Unię Europejską, jako jeden z pięciu rejonów produkcji wysokiej klasy sadzeniaków. Jednakże nawet na tym obszarze w ciągu kilku ostatnich lat infekcje tym wirusem drastycznie wzrosły. Prawdopodobną przyczyną tego zjawiska był wzrost populacji mszyc w następstwie ocieplania klimatu lub/i pojawienie się szczepów PVY, które łatwiej się rozprzestrzeniają (Kirchner i in., 2009). Prawdopodobnie, podobny mechanizm powodował wyższe infekcje w Puławach i Jędrzejowie w południowej – cieplejszej części Polski. Wprawdzie badania populacji mszyc nie były przedmiotem badań autora, jednak niewykluczone, że wielkość i skład gatunkowy populacji w północnej Polsce, w Grudziądzu i Augustowie był różny. Efektem tego mógł być niższy procentowy udział porażonych roślin. Basky (Basky, 2002) badając na Węgrzech dynamikę pojawiania się mszyc i zainfekowanie ziemniaków zauważył, że przesunięcie czasowe początku okresu lotów mszyc, na połowę czerwca skutkuje niskim poziomem infekcji bulw ziemniaka. Basky stwierdza również, że skład gatunkowy mszyc występujących, w różnych lokalizacjach wpływa na różny poziom zakażenia patogenem. Boukhris-Bouhachem i in. (2011), badali wpływ składu gatunkowego mszyc na infekcję ziemniaków izolatem z grupy PVY^{NTN}. Najbardziej wydajnym gatunkiem mszyc był *Myzus persicae*, którego skuteczność transmisji wynosiła od 86% dla form uskrzydłych, do 95% dla form bezskrzydłych. Gatunkami, których skuteczność przekroczyła 60% były też: *Aphis spiraecola*, *Brachycaudus helichrysi* oraz *Aphis gossypii*. Na stopień infekcji tytoniu ma też zapewne bliskie sąsiedztwo plantacji ziemniaków. Największe infekcje odmian podatnych tytoniu występowały w Jędrzejowie (69,8 %) i Puławach (52,4 %) w województwach odpowiednio świętokrzyskim i lubelskim. W tych województwach była jednocześnie największa powierzchnia upraw ziemniaka spośród czterech województw, w których prowadzono doświadczenia polowe (Rocznik statystyczny rolnictwa, 2007; 2008; 2009). W pozostałych lokalizacjach procentowy udział zainfekowanych roślin tytoniu był niższy, co było zbieżne z mniejszą powierzchnią uprawy ziemniaka w tych rejonach.

Na nasilenie infekcji mogło mieć wpływ stosowanie zmianowania na polach doświadczalnych. Tylko w Augustowie stosowano płodozmian z udziałem roślin zbożowych. W pozostałych rejonach plantacje tytoniu zlokalizowane były w tych samych miejscach przez cały okres prowadzenia doświadczeń polowych. W Puławach i Jędrzejowie dodatkowo plantacja doświadczalna zlokalizowana była w bezpośrednim sąsiedztwie plantacji produkcyjnych, co mogło w znaczący sposób wpłynąć na dużą liczbę zainfekowanych roślin. Podobne efekty braku zmianowania obserwował Gavran (1997). Na polach, na których po raz

pierwszy produkowano sadzeniaki infekcja wirusem wynosiła 10%. W drugim roku prowadzenia uprawy na tym samym polu bez zmianowania zainfekowanie wynosiło już 60%.

5.2. Serologiczne zróżnicowanie izolatów wirusa Y ziemniaka

Zróżnicowanie serologiczne badanych izolatów badano na podstawie reakcji z przeciwciałami monoklonalnymi anti-PVY oraz anti-PVY^N. Ponieważ pobierane próbki liści tytoniu posiadały widoczne nekrozy nerwów, wiadomo było, że wszystkie badane izolaty należały do szczepu PVY^N. Zastosowanie tych przeciwciał pozwoliło, na rozróżnienie 2 grup w obrębie tego szczepu: PVY^{NW} i PVY^{NTN}. Wykorzystano tu pewną zależność, mianowicie izolaty należące do grupy PVY^{NW} posiadają genom, powstały przez rekombinację genomów szczepów PVY^N i PVY^O. Ponieważ izolaty PVY^{NW} posiadają gen białka płaszczka (CP) podobny do szczepu PVY^O, dlatego białko płaszczka przez nie kodowane jest wykrywane tylko przez przeciwciała anti-PVY (Chrzanowska, 1994).

Procentowy udział izolatów należących do poszczególnych grup zależał od lokalizacji doświadczenia oraz roku prowadzenia badań. W Puławach i Augustowie w 2006 roku występowały jedynie izolaty z grupy PVY^{NW}, podczas gdy w Jędrzejowie i Grudziądzu poza izolatami typu PVY^{NW} pojawiały się izolaty należące do PVY^{NTN}. Udział PVY^{NTN} w Jędrzejowie wyniósł 15,4%, a w Grudziądzu 19,1%. W kolejnych latach izolaty typu PVY^{NTN} występowały już we wszystkich lokalizacjach. W 2007 r. największy ich udział obserwowano w Grudziądzu – 53,9%, najniższy w Puławach – 10%. W kolejnym roku w Jędrzejowie obserwowany był drastyczny wzrost udziału izolatów z grupy PVY^{NTN} do poziomu 73,1%. Biorąc pod uwagę ogółem zróżnicowanie serologiczne izolatów zebranych w Polsce, można zaobserwować stale powiększający się udział izolatów z grupy PVY^{NTN} od 8,4% w 2006 r. do 32,7% w roku 2008. Na podstawie danych pochodzących z programu CORESTA można zauważyć, że w Europie zachodniej, głównie w Niemczech, Szwajcarii i Francji, dominują izolaty z grupy PVY^{NTN}. Średni udział PVY^{NTN} w latach 2003-2005 w Niemczech wynosił 94%, podczas gdy w tym samym okresie w Polsce jedynie 15%. (Doroszewska, 2005).

Występowanie izolatów z grupy PVY^{NTN} obserwuje się nie tylko w Europie. W Japonii obecność izolatu z grupy PVY^{NTN} stwierdzono już w 1992 r. i był to pierwszy opisany przypadek pojawienia się izolatu z grupy PVY^{NTN} w Azji. Wystąpił on w prefekturze Nagasaki na 2 odmianach ziemniaków: Nishiyutaka i Dejima. Wówczas obserwowano nieznane dotąd objawy nekroz na bulwach (Ohshima i in., 2000). Na początku lat dziewięćdziesiątych w USA i Kanadzie prowadzono badania nad występowaniem wirusa Y ziemniaka na sadzeniakach ziemniaka (Ellis i in., 1997). Zgromadzono 3000 próbek z 39

różnych odmian z siedmiu prowincji Kanady i pięciu stanów w USA. W 632 z nich wykryto obecność PVY. Wśród nich nie stwierdzono występowania szczepu PVY^N, 7,2 % izolatów stanowił szczep PVY^C, zaś pozostałe należały do szczepu PVY^O. Dzięki użyciu siedmiu różnych przeciwciał monoklonalnych, udało się wyróżnić wśród tego szczepu aż dziewięć serotypów nazwanych PVY^O 1-9. Podobne badania przeprowadzono później na plantacjach ziemniaków w stanie Oregon i Washington w północno-zachodniej części USA. Infekcja szczepem PVY^O w Oregonie była zróżnicowana w zależności od odmiany i wynosiła od 0 % na odmianie Alturas, Cal Red i Yukon Gold do nawet 100 % na odmianie Nooksack. Mniej infekcji wirusem PVY występowało w stanie Washington od 0 % na odmianie Atlantic do 71,9 % na odmianie Russet Norkotah 3 (Crosslin i in., 2006). Liczba zainfekowanych roślin w okresie prowadzenia badań zmieniała się i w roku 2003 była wyższa niż w 2001. Po pojawieniu się na plantacjach sadzeniaków dość licznych infekcji szczepem PVY^N w roku 2000, agencje certyfikujące podjęły szybkie działania w celu ograniczenia tych zagrożeń poprzez testowanie na dużą skalę przeciwciałami anti PVY^N. To pozwoliło na zahamowanie dalszego wzrostu infekcji w kolejnych latach. Zakażenia szczepem PVY^{N:O} w roku 2001 występowało stosunkowo rzadko, ale w roku 2002 znacznie wzrosło i utrzymywało się na zbliżonym poziomie w roku 2003. Ostatnie badania pozwalają przypuszczać, że szczep PVY^{N:O} staje się dominującą formą wirusa w USA. Co więcej ogólny obraz udziału poszczególnych form wirusa może zakłócać fakt, że w USA agencje certyfikujące, do rozpoznawania poszczególnych jego form wykorzystują tylko testy serologiczne, podczas gdy PVY^{N:O} można rozpoznać przez zastosowanie zarówno testów ELISA jak i technik molekularnych (Crosslin i in., 2005, Piche i in., 2004). Możliwa jest więc sytuacja, że formy PVY^{N:O} są kwalifikowane jako PVY^O (Singh i in., 2003). W tym samym czasie, prowadzono podobne badania również na wschodnim wybrzeżu – w północno-wschodniej części USA w stanach New York i Maine (Baldauf i in., 2005). Spośród 394 zgromadzonych izolatów PVY^O stanowiły 98 %. 8 izolatów nie należało do PVY^O, ponieważ powodowały nekrozy nerwów na tytoniu lub reagowały z przeciwciałem 1F5 (anti-PVY^N). Ostatecznie dwa z nich określono jako PVY^{N:O}, kolejne dwa jako PVY^{NTN}, jeden jako PVY^N, a trzy izolaty jako PVY^O-O5. Izolaty PVY^N i PVY^{NTN} wykryte w tych badaniach były pierwszymi przypadkami występowania tych form wirusa w północno-wschodniej części USA. Izolaty PVY^O-O5 pomimo, że należą do szczepu PVY^O i posiadają cały genom jak typowe PVY^O, to są jednocześnie wykrywane przez przeciwciała 1F5 rozpoznające szczep PVY^N. Jak wykazały badania, jest to spowodowane mutacją punktową typu pojedynczej substytucji aminokwasu w obrębie białka płaszczka (Karasev i in., 2009). W Kanadzie w latach 1998-2002 około połowę

badanych izolatów wirusa stanowiła forma PVY^{N:O}. Dalsze badania wykazały, że zostały one przeniesione przez zakażone sadzeniaki pochodzące ze stanów: Minnesota, Montana, North Dakota w USA i innych plantacji w prowincji Manitoba w Kanadzie (Singh i in., 2003). Pierwszy przypadek wystąpienia szczepu PVY^N w Kanadzie wykryto na tytoniu w prowincji Oregon w 1989r (McDonald i Kristjansson, 1993). Już rok później ta forma pojawiła się na plantacjach ziemniaka w Kanadzie (Ellis i in., 1997). Szczep PVY^{NTN} po raz pierwszy w Kanadzie wykryto na plantacji tytoniu w 2007 r. (Xu, 2008). W Tunezji w latach 2003-2005 w czterech głównych rejonach uprawy ziemniaków na sadzeniaki, prowadzono badania nad PVY (Boukhris-Bouhachem i in., 2010). 90 % badanych izolatów pozyskanych w latach 2004-2005 stanowił szczep PVY^N. Rok później izolaty z grupy PVY^{NTN} stanowiły blisko 80% wszystkich badanych, a 11% stanowiły izolaty PVY^N. Szczep PVY^O, który jeszcze dwadzieścia lat temu dominował teraz stanowi zaledwie 7 % izolatów.

Na podstawie badań prowadzonych w różnych krajach świata na ziemniaku i tytoniu można stwierdzić, że udział izolatów należących do szczepu PVY^N stale wzrasta. Dominują głównie formy zrekombinowane PVY^{NW}(PVY^{N:O}) oraz PVY^{NTN}. Zwiększający się udział izolatów z grupy PVY^{NTN}, jest o tyle niebezpieczny, że te formy wirusa są o wiele bardziej zjadliwe dla tytoniu. Rośliny przez nie infekowane mają zwykle silniejsze objawy. Również rozwój objawów jest szybszy niż u PVY^{NW}. Ponadto izolaty z grupy PVY^{NTN} są bardzo niebezpieczne dla upraw ziemniaków, ponieważ oprócz objawów wywoływanych na częściach nadziemnych roślin powodują nekrozy na bulwach (PTNRD *ang. Potato Tuber Necrotic Ringspot Disease*). W ostatnim czasie w Syrii wykryto izolaty, które za pomocą testów serologicznych określono, jako szczep PVY^O (Chikh i in., 2010). Jednakże, po zakażeniu nimi tytoniu, powodowały nekrozy nerwów, co sugerowałoby, że są to izolaty należące do grupy PVY^{NW}. Po dalszych testach, okazało się, że część z nich wywołuje nekrozy na bulwach ziemniaków, co jest charakterystyczne dla formy PVY^{NTN}. Z tego też powodu wydzielono nową grupę w obrębie szczepu PVY^N i nazwano ją PVY^{NTN-NW}.

5.3. Molekularne zróżnicowanie badanych izolatów wirusa (RFLP)

Wykorzystanie metod molekularnych do badania zróżnicowania izolatów PVY dostarczyło nowych elementów rozszerzających charakterystykę wirusa. Badaniami polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) objęto 60 izolatów wirusa, w tym 40 krajowych, 14 niemieckich i 6 chorwackich. Na podstawie wzorów restrykcyjnych skonstruowano drzewa pokrewieństw przy wykorzystaniu dwóch różnych algorytmów: UPGMA oraz Neighbor-Joining. Drzewa skonstruowane na podstawie wzorów

restrykcyjnych po trawieniu enzymami Hin6 I i Sdu I pozwoliły na grupowanie badanych izolatów na grupy PVY^{NW} i PVY^{NTN}, chociaż zdarzały się pojedyncze przypadki, zakwalifikowania badanych izolatów z grupy PVY^{NW} do grupy PVY^{NTN} i odwrotnie. Przypuszcza się, że może to być wynikiem nieprawidłowej klasyfikacji serologicznej, spowodowanej mutacją punktową w obrębie regionu odpowiedzialnego za kodowanie epitopu w białku płaszczka (CP), rozpoznawalnego przez odpowiednie przeciwciała. Wśród wielu badanych izolatów, pomimo pochodzenia z różnych części kraju i/lub Europy stwierdzono identyczne wzory restrykcyjne. Daje to podstawę do stwierdzenia, że zidentyfikowane genotypy są szeroko rozpowszechnione i jednocześnie występują w wielu krajach Europy. Zastosowane w badaniach enzymy restrykcyjne nie pozwoliły jednak na odróżnienie za pomocą RFLP izolatów zdolnych od niezdolnych do przełamania odporności warunkowanej genem *va* odmiany VAM i Wiślica. Te same wzory restrykcyjne uzyskiwano dla izolatów przełamujących i nieprzełamujących odporności tych odmian. Metodę RFLP szeroko stosuje się do rozpoznawania i klasyfikacji genotypów wirusów. Blanco-Urgoiti (1996) zastosował tą metodę do klasyfikacji szczepów wirusa Y ziemniaka. Na podstawie wzorów restrykcyjnych uzyskanych po trawieniu pięcioma restryktazami (Dde I, Eco RV, Hinf I, Rsa I, Taq I) fragmentu DNA o długości 879 nukleotydów, obejmującego gen białka płaszczka (CP) i region 3'NTR, skonstruowano drzewa pokrewieństw. Badane izolaty zostały przyporządkowane do trzech klastrow odpowiednio PVY^O, PVY^N i PVY^{NP}. Dwa pierwsze pokrywały się z klasyfikacją dokonaną metodami serologicznymi. Trzecią grupę PVY^{NP} (ang. *non-potato*) stanowiły izolaty nie ziemniaczane, pochodzące z tytoniu i papryki. Rozwinięciem tych badań była analiza izolatów należących do szczepu PVY^C. Na podstawie otrzymanych wzorów restrykcyjnych stworzono drzewa pokrewieństw. Pomimo dotychczasowego przekonania, że szczep PVY^C jest jednorodny, tutaj udało się udowodnić, że w jego obrębie istnieją 2 szczepy genetyczne PVY^{C1} i PVY^{C2} (Blanco-Urgoiti i in., 1998). Aby to potwierdzić, cytowani wyżej autorzy zsekwencjonowali 4 z badanych izolatów. Stwierdzono, że obecność waliny, jako pierwszego aminokwasu w białku płaszczka jest odpowiedzialna za wyróżnienie szczepu genetycznego PVY^{C2}. Podobne badania prowadzili Glais i inni (1998), również wykorzystując technikę RFLP, poszukiwali regionów odpowiedzialnych za nekrotyczny charakter wirusa. Ponieważ zastosowanie pełnej długości cDNA uniemożliwiałoby wskazanie tych regionów, badacze wykorzystali cDNA amplifikowany w dwóch fragmentach: o długości 4063 i 5670 nukleotydów. Do badań użyto 10 izolatów należących do czterech grup: PVY^N, PVY^{NTN}, PVY^{NW} i PVY^O, różniących się zdolnością do wywoływania nekroz na tytoniu i bulwach ziemniaków. Zamplifikowane

fragmenty DNA poddawane były trawieniu przez siedem enzymów restrykcyjnych. W efekcie otrzymano wzory restrykcyjne RFLP. Dla pierwszych 4063 nukleotydów analiza wzorów restrykcyjnych wykazała obecność 3 klastrów, które umożliwiły odróżnienie od siebie izolatów PVY^N (klaster A), izolatów PVY^{NTN} i PVY^{NW} (klaster B) i izolatów PVY^O (klaster C). Analiza restrykcyjna drugiej części genomu o długości 5670 nukleotydów wykazała istnienie 2 klastrów: izolaty PVY^N i PVY^{NTN} (klaster D) i izolatów należących do PVY^O i PVY^{NW} (klaster E). Na podstawie znanych właściwości biologicznych badanych izolatów i uzyskanego grupowania na podstawie wzorów restrykcyjnych RFLP wywnioskowano, że determinanty wywoływania nekroz na tytoniu z większym prawdopodobieństwem mieszczą się w 5' połowie genomu, podczas gdy determinanty nekroz na bulwach ziemniaków zlokalizowane są raczej w 3' połowie genomu wirusa.

Dzięki zastosowaniu metody RFLP udało się również ustalić, że izolaty PVY^{NW} i PVY^{NTN}, są pojedynczymi lub wielokrotnymi rekombinantami powstałymi ze szczepów PVY^O i PVY^N. W badaniach wykorzystano 14 izolatów, których wszystkie geny z osobna amplifikowano i poddawano trawieniu (RFLP). Wskazano, że genomy izolatów należących do PVY^{NW} i PVY^{NTN} posiadają strukturę mozaiki tzn., że zawierają sekwencje charakterystyczne zarówno dla PVY^N jak i PVY^O (rys. 4) (Glais i in., 2002). Dodatkowo dzięki przeprowadzonym badaniom potwierdzono, że białko HC-Pro bierze udział w powstawaniu nekroz na tytoniu, a białka NIa, NIb i CP nekroz na bulwach ziemniaków.

W niniejszej pracy podjęto również próbę oceny dystansu genetycznego dzielącego poszczególne izolaty, który oceniono na podstawie długości „gałęzi” dendrogramów. Podobnie jak w przypadku rozróżniania izolatów na grupy PVY^{NW} i PVY^{NTN}, najbardziej użyteczne okazały się drzewa filogenetyczne UPGMA, skonstruowane na podstawie wzorów restrykcyjnych pochodzących z trawienia enzymem Hin6 I (rys 39) i Sdu I (rys. 43). Łatwo zauważyć długie główne „gałęzie” drzew rozdzielające badane izolaty na klaster PVY^{NW} i PVY^{NTN}, co świadczy o dużym dystansie genetycznym dzielącym te dwie grupy izolatów. W obrębie poszczególnych klastrów długość „gałęzi” jest niewielka, co świadczy o bliskim pokrewieństwie izolatów wirusa. Warto zauważyć jednak, że pomimo niewielkiego dystansu genetycznego dzielącego poszczególne izolaty w obrębie jednego klastra, istnieją pojedyncze izolaty, których „gałęzie” są nieco dłuższe np. izolat 9/N/07, czy 27/J/08, co sugeruje, że dystans genetyczny dzielący te izolaty od pozostałych jest większy. Ma to odzwierciedlenie w charakterze wywoływanych objawów na tytoniu. Izolat 27/J/08 charakteryzował się wybitnie wysoką zjadliwością. Wywoływał on bardzo silne nekrozy pojawiające się już po kilku dniach od zakażenia rośliny. Przełamywał on również odporność odmian Wiślica i VAM.

Czułość zastosowanej metody RFLP była jednak niewystarczająca dla odróżnienia za jej pomocą izolatów przełamujących i nieprzełamujących odporności odmian VAM i Wiślica. Dlatego też, zdecydowano się na zsekwencjonowanie całych genomów kilkunastu wybranych izolatów celem poszukiwania determinantów odpowiadających za tą zdolność.

5.4. Zdolność izolatów wirusa do przełamania odporności tytoniu

Proces infekcji wirusowej składa się z kilku etapów: mechaniczne wniknięcie wirusa do komórki przez ścianę komórkową i błonę komórkową, dekapsydacja, replikacja RNA, translacja. Namnożony wirus znajduje się w cytoplazmie. Jego rozprzestrzenianie się do kolejnych komórek może odbywać się tylko poprzez plasmodesmy. W przypadku braku ze strony gospodarza reakcji typu nadwrażliwości, zakażone komórki, w których wirus przeszedł pełny cykl infekcyjny, nie ulegają śmierci, ale stają się rezerwuarem namnożonego wirusa, który atakuje kolejne komórki i tkanki. Pojawiające się po pewnym czasie od zakażenia objawy są sumą zmian fizjologicznych i strukturalnych powodowanych przez patogena (Maule i in., 2002). Ponadto lokalne na początku objawy w miejscu zakażenia, po pewnym czasie przeobrażają się w porażenie systemiczne, powodowane przez rozprzestrzenianie się wirusa przez naczynia przewodzące (ang. long-distance transport) (Scholthof, 2005). Genomy roślinne zawierają dużą liczbę genów odpowiedzialnych za rozpoznanie i unieszkodliwienie potencjalnych patogenów. Co więcej, często są one zgrupowane w klastry, a czasami zawierają geny odporności na patogeny taksonomicznie ze sobą niespokrewnione (Crute i Pink, 1996).

Odporność mogą zapewniać naturalnie występujące u niektórych odmian allele recesywne (Wernsman, 1992). Inny rodzaj odporności zapewnia gen *Nafr* przeniesiony z dzikiego gatunku *N. africana* do tytoniu uprawnego (Lewis, 2007; Doroszevska, 2010). Odporność może być również warunkowana obecnością transgenu (Czubacka 2010). Jednakże znalezienie i wykorzystanie pożądaných źródeł odporności zabezpieczających przed wszystkimi występującymi wariantami wirusa, z jednoczesną wysoką jakością form uprawnych, jest niezwykle trudne.

W naszych badaniach do określenia zdolności przełamania odporności tytoniu przez PVY użyto odpornych odmian VAM i Wiślica. W odmianie VAM, odporność na PVY i kilka innych potywirusów: TEV (ang. *Tobacco Etch Virus*), TVMV (ang. *Tobacco Vein Mottling Virus*) zapewnia recesywny gen *va*. Odmiana ta powstała w wyniku naświetlania promieniami X i selekcję genotypów odpornych na PVY (Koelle, 1961). Ten rodzaj odporności wykorzystywany jest w większości odmian amerykańskich i pochodzących z

Europy Zachodniej. Odporność odmiany Wiślica, podobnie jak innych polskich odmian jest trudna do zdefiniowania, z uwagi na niedostateczne udokumentowanie jej pochodzenia. Jednym z możliwych źródeł mogły być odmiany orientalne lub półorientalne. Jednakże fakt, że odporność odmiany Wiślica warunkowana jest pojedynczym recesywnym genem, może świadczyć o zbliżonym mechanizmie, opartym o delecję genu warunkującego podatność na PVY, jaki występuje u odmiany VAM (Doroszevska, 2004).

W celu odszukania molekularnych determinantów odpowiedzialnych za przełamywanie odporności odmian VAM i Wiślica analizowano sekwencję aminokwasową wszystkich białek kodowanych przez poszczególne geny wirusa. W całym genomie wirusa znaleziono dwa miejsca, w których mutacje powodowały przełamywanie odporności tytoniu. Obydwa miejsca zlokalizowane były w obrębie genu kodującego białko VPg. Substytucji ulegała seryna (S) na glicynę (G) w pozycji 101 lub lizyna (K) na treoninę (T), albo kwas glutaminowy (E), w pozycji 105. Wśród badanych izolatów nie stwierdzono wystąpienia obu mutacji jednocześnie. Ponadto, mutacje w pozycji 101, jak i w pozycji 105, obserwowano zarówno wśród izolatów PVY^{NW} jak i PVY^{NTN}.

Uzyskane wyniki są zbieżne z obserwacjami badaczy japońskich, którzy donosili, że mutacja w pozycji 105 białka VPg, polegająca na substytucji lizyny (K) na kwas glutaminowy (E), prowadzi do nabycia przez badane izolaty zdolności do przełamywania odporności odmiany VAM (Masuta i in., 1998). Jednakże badania prowadzone przez Masutę i współpracowników dotyczyły izolatów uzyskanych w warunkach laboratoryjnych. Autorzy ci wykorzystali połowe izolaty, nieprzełamujące odporności VAM, z których przez wielokrotne pasażowanie na odmianie VAM wyselekcjonowali mutacje posiadające zdolność do przełamywania odporności tej odmiany. W badaniach prowadzonych przez autora niniejszej rozprawy wykorzystano izolaty połowe.

Obserwowana w badaniach własnych mutacja w pozycji 101, która umożliwia przełamywanie odporności odmian VAM i Wiślica, występowała również wśród izolatów używanych w badaniach prowadzonych nad wpływem wielokrotnego pasażowania izolatu SON41 na przełamywanie odporności genu *va*² (Lacroix i in., 2011). Co więcej, mutacja w pozycji 119 białka VPg polegająca na substytucji kwasu asparaginowego (D) na glicynę (G) lub kwasu asparaginowego (D) na alaninę (A), również powoduje przełamywanie odporności warunkowanej genem *va* (Lacroix i in., 2011). Podobne wyniki uzyskano w badaniach nad przełamywaniem genów *pvr* warunkujących odporność papryki na PVY. Wskazano 6 pozycji w centralnej części VPg jako potencjalne mutacje prowadzące do przełamywania odporności (Ayme i in., 2007).

Nad zagadnieniem przełamania odporności odmiany VAM, warunkowanej recesywnym genem *va*, pracował również Nicolas i in. (1997), którzy do badań wykorzystali wirusa TVMV. Użyli oni dwóch izolatów wirusa: TVMV-S, który przełamował odporność warunkowaną genem *va* oraz TVMV-WT, nieprzełamujący odporności. W sekwencjach aminokwasowych badanych białek VPg stwierdzono mutacje w sześciu pozycjach, przy czym cztery z nich były niezbędne do przełamania odporności tytoniu (Nicolas i in., 1997). Chociaż sekwencje aminokwasowe białek VPg, pochodzących z TVMV i PVY, znacznie się różnią, to uzyskane metodą Chou-Fasmana modele struktury drugorzędowej tych białek są bardzo do siebie podobne, szczególnie w pobliżu C-końca. Co więcej, obserwowane mutacje zlokalizowane były w strukturalnie podobnych miejscach. Przypuszcza się, że te mutacje mogą powodować zmiany w konformacji białka VPg, które wpływają na zdolność zmutowanych białek do oddziaływania z innymi cząsteczkami, biorącymi udział w procesie infekcyjnym (Masuta i in., 1998).

Prawdopodobnym jest, że mechanizm przełamania odporności warunkowanej recesywnym genem *va*, może być zbliżony do przełamania odporności papryki warunkowanej genem *pvr2*. Produkt genu *pvr2*, to eukariotyczny czynnik inicjacji translacji eIF4E, zbudowany z 228 aminokwasów. Jego dwa recesywne allele *pvr2*⁰ i *pvr2*¹ zapewniają odporność odpowiednio: na szczep PVY-0 i jednocześnie na PVY-0 i 1. Te dwa allele różnią się od allelu dominującego warunkującego podatność na PVY dwiema mutacjami punktowymi. Pierwsza z nich jest identyczna dla obydwu alleli warunkujących odporność, zaś druga jest charakterystyczna dla każdego z alleli występujących u roślin odpornych. Dowiedziono, że oddziaływanie białka VPg z białkiem eIF4E jest niezbędne do zakażenia rośliny. Wspomniane wyżej mutacje w eIF4E warunkujące odporność na PVY, uniemożliwiają interakcję białka VPg wirusa z eIF4E gospodarza, co powoduje niezdolność wirusa do zakażenia rośliny (Ruffel i in., 2002). Natywne białko eIF4E posiada miejsce do którego przyłączane są mRNA i białko eIF4G, będące składową kompleksu inicjacji translacji – eIF4F. Czynnik eIF4G przyłącza helikazę eIF4A i złożony z wielu podjednostek czynnik eIF3, to z kolei prowadzi do przyłączenia podjednostki 40S rybosomu i w efekcie inicjuje proces translacji (Gingras i in., 1999). Przypuszcza się, że wirusowe białko VPg może spełniać podobną rolę jak struktura czapki na 5' końcu mRNA komórkowego i być przyłączane do czynnika eIF4E zamiast niej, dzięki czemu wstrzymana zostaje translacja mRNA gospodarza, w bardzo krótkim czasie po zainfekowaniu komórki (Grzela i in., 2006). Odporność roślin na potywirusy polega więc na braku możliwości interakcji białka VPg z eIF4E, będącego wynikiem mutacji w obrębie genu kodującego czynnik eIF4E. Przypuszcza

się, że mechanizm odporności tytoniu warunkowany recesywnym genem *va*, jest podobny do tego warunkowanego genem *pvr* u papryki. Szczególnie, że mutacje w pozycjach 101 i 105, w sekwencji aminokwasowej białka VPg opisane powyżej, występowały również u izolatów wirusa pochodzących z papryki zdolnych do przełamania odporności warunkowanej genem *pvr2* (Moury 2010).

Chociaż w uzyskanych przez autora wynikach tylko w obrębie białka VPg odnaleziono determinanty molekularne odpowiedzialne za zdolność do przełamania odporności warunkowanej przez gen *va*, to znane są doniesienia literaturowe, o mutacjach w innych genach potywirusów, które powodują przełamywanie odporności. Wirus mozaiki i liścizwoju grochu (PSbMV) (ang. *Pea seed-borne mosaic virus*), PVY na papryce i wirus mozaiki sałaty LMV (ang. *Lettuce mosaic virus*), przełamują odpowiednie geny odporności: *sbm*, *pvr4* i *mo1*. Determinanty genetyczne odpowiedzialne za to zjawisko zlokalizowane są odpowiednio w obrębie genów: P3/6K1, Nib i CI/6K2 tych potywirusów (Johansen i in., 2001; Abdul-Razzak i in., 2009; Janzac i in., 2010).

5.5. Zróżnicowanie sekwencji i klasyfikacja filogenetyczna

Określenie zróżnicowania genów i pełnych sekwencji genomu wirusa wybranych izolatów pozwoliło na ich porównanie z sekwencjami zamieszczonymi w GenBanku. Wśród badanych izolatów znalazły się zarówno przełamujące jak i nieprzełamujące odporności odmian VAM i Wiślica oraz należące do PVY^{NW} jak też do PVY^{NTN}. Badane izolaty pochodziły z Niemiec, Chorwacji oraz z 4 lokalizacji w Polsce.

Na podstawie badań zbieżności klasyfikacji opartej na serotypie izolatów z ich genotypem ustalonym na podstawie sekwencji ustalono, że dwie pozycje aminokwasowe – 12 i 28 białka płaszczka mogą wchodzić w skład epitopu rozpoznawanego przez używane przeciwciała monoklonalne i brać udział w reakcji z nimi. Badane izolaty PVY 8 i PVY 9 pomimo posiadanego serotypu O (brak reakcji z przeciwciałami anti-PVY^N), genotypowo należały do PVY^{NTN}. Podczas wnikliwej analizy sekwencji aminokwasowej białka płaszczka ustalono, że w pozycji 12 i 28 nastąpiła substytucja polegająca, w obu przypadkach, na zamianie lizyny (K) na argininę (R).

Podobne badania prowadzono w Japonii na syryjskim izolacie wirusa – PVY-12. W testach serologicznych reagował on z dwoma przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko szczepom PVY^{O,C} i PVY^N, chociaż białko płaszczka posiadał takie jak u szczepu nekrotycznego. Analiza sekwencji genu CP, ujawniła mutację w pozycji 29. Substytucja z kwasu glutaminowego występującego wśród izolatów należących do szczepu PVY^N, na

glicynę charakterystyczną, dla izolatów ze szczepu PVY^O spowodowała, że białko płaszczka reagowało z przeciwciałami skierowanymi przeciwko szczepowi O i C (Chikh i in., 2007). Dalsze badania wykazały, że glicyna w tej pozycji (G₂₉) jest silnie zakonserwowana wśród izolatów należących do PVY^O, PVY^C i PVY^{NW}, podczas gdy kwas glutaminowy lub glutamina (E₂₉ lub Q₂₉) jest silnie konserwowana u PVY^N i PVY^{NTN}. Takie silnie zakonserwowane G₂₉ oraz E₂₉ i Q₂₉, obserwowano również w badanych przez autora izolatach odpowiednio u PVY^{NW} i PVY^{NTN}.

Badania nad rozpoznawaniem przez przeciwciała monoklonalne 1F5 (anti-PVY^N, szeroko stosowane w USA w programach certyfikacji sadzeniaków), epitopu nekrotycznego na powierzchni białka płaszczka prowadził Karasev i in. (2010). Zauważyli oni, że obecność w pozycji 98 glutaminy (Q), powoduje rozpoznawanie białka przez ten rodzaj przeciwciała, podczas gdy występowanie w tym miejscu argininy (R), skutkowało brakiem reakcji. Badania dotyczyły izolatów północno-amerykańskich. W badaniach autora niniejszej rozprawy, również w pozycji 98 występuje taki sam różnicujący aminokwas. Izolaty należące do PVY^{NW} posiadały argininę (R), zaś PVY^{NTN} – glutaminę (Q). Z uwagi na to, że zarówno północno-amerykańskie jak i europejskie izolaty w obrębie poszczególnych szczepów posiadają ten sam aminokwas, można przypuszczać, że miejsce to jest silnie konserwowane.

Badania nad zmiennością białka CP prowadzono również na izolatach LYE 84 i LYE 84.2, pochodzących z pomidorów. Białko to, posiadało motyw DAG w pozycjach 6-8, który jest niezbędny do przenoszenia wirusa przez mszyce (Morel i in., 2000), jak również motyw MVWCIENG, bardzo mocno konserwowany u wielu potywirusów (Hall i in., 1998). Występowanie obydwu motywów zostało również potwierdzone w białkach płaszczka izolatów badanych przez autora rozprawy.

Podczas badania zróżnicowania genomu wirusa poszukiwano również molekularnych determinantów objawów nekrotycznych na tytoniu. Chachulska (1997) donosiła, że determinanty nekroz nerwów na tytoniu są usytuowane poza sekwencjami końcowymi 3' i 5' genomu wirusa Y ziemniaka. Na tej podstawie we Francji poszukiwano determinantów w obrębie genów P1, HC-Pro i P3. Do badań wykorzystano izolaty PVY^N-605 (powodujący powstawanie nekroz na tytoniu) i PVY^O-139 (nie powodujący nekroz), oraz uzyskane metodami molekularnymi zmodyfikowane sztuczne klony z hybrydowymi genomami (Tribodet i in., 2005). Modyfikacje genomu polegały na zamianie fragmentu genomu PVY^N-605, w obrębie genów P1, HC-Pro i P3, homologicznymi fragmentami genomu PVY^O-139. Ponieważ utrata zdolności wywoływania nekroz wystąpiła w przypadku wariantów z wklonowanym genomem pomiędzy 2087, a 2591 nukleotydem (358 aminokwasem w białku

HC-Pro, a 60 aminokwasem w białku P3), oznaczało to, że ten właśnie region jest odpowiedzialny za powstawanie nekroz. Wykazano, różnice w sekwencji aminokwasowej tych białek w 9 pozycjach, przy czym tylko dwie pozycje aminokwasowe w pobliżu C-końca białka HC-Pro – 400 i 419, miały wpływ na indukowanie nekroz na tytoniu. Miała tu miejsce substytucja z argininy (R) na lizynę (K) w pozycji 400 i substytucja z kwasu asparaginowego (D) na kwas glutaminowy (E) lub glicynę (G) w pozycji 419 (Tribodet i in., 2005). W badaniach własnych również obserwowano w pozycjach 400 i 419 białka HC-Pro, odpowiednio lizynę i kwas glutaminowy. Wydaje się to zrozumiałe, gdyż wszystkie badane izolaty wywoływały nekrozy na tytoniu.

W dalszych badaniach (Rolland i in., 2009) starano się wyjaśnić, czy do wywołania nekroz niezbędna jest obecność K_{400} i E_{419} jednocześnie. W tym celu wykorzystano izolat PVY^N-605 oraz jego pochodne PVY^{KR}, PVY^{ED} i PVY^{KRED}, będące sztucznie uzyskanymi mutantami. PVY^{KR} miał zmodyfikowany tylko nukleotyd 2213 z A na G, co skutkowało w sekwencji aminokwasowej zmianą w pozycji 400 z lizyny (K) na argininę (R) i zachowanym w pozycji 419 – kwasem glutaminowym (E). PVY^{ED} miał zmodyfikowany tylko nukleotyd 2271 z A na C, co skutkowało w sekwencji aminokwasowej zmianą w pozycji 419 z kwasu glutaminowego (E) na kwas asparaginowy (D) i zachowaną w pozycji 400 – lizyną (K). Mutant PVY^{KRED} w pozycjach aminokwasowych 400 i 419 posiadał argininę (R) i kwas asparaginowy (D), identycznie jak izolat PVY^O-139. Izolaty PVY^{KR} i PVY^{ED} nie powodowały powstawania nekroz na tytoniu, co oznaczało, że do ich wywołania niezbędna jest obecność aminokwasów K_{400} i E_{419} jednocześnie (Rolland i in., 2009). Ponadto brak zdolności wywoływania nekroz przez izolat PVY^{KRED}, który poza aminokwasami w pozycjach 400 i 419 posiadał sekwencję izolatu PVY^N-605, sugerował, że są to jedyne aminokwasy odpowiadające za tą właściwość.

Ostatnie doniesienia sugerują jednak, że czasami aminokwasy K_{400} i E_{419} mogą być niewystarczające do indukcji nekroz. Otóż w USA, z ziemniaków pozyskano izolat L26, który we wspomnianych pozycjach posiadał zarówno lizynę jak i kwas glutaminowy. Niestety objawy, jakie wywoływał, bardziej przypominały przejaśnienia, niż nekrozy. W wyniku przeprowadzonych badań okazało się, że za utratę zdolności wywoływania nekroz odpowiedzialna jest mutacja 1627 nukleotydu z A na G, co skutkuje substytucją aminokwasu w obrębie białka HC-Pro w pozycji 205 z kwasu asparaginowego (D) na glicynę (G) (Hu i in., 2009). Dodatkowo na podstawie modelowania struktury drugorzędowej białka ustalono, że wszystkie trzy aminokwasy eksponowane są na zewnętrznej powierzchni białka. Powyższe

wyniki sugerują, że molekularne determinanty indukowania nekroz na tytoniu są złożone i mogą tu być zaangażowane również inne aminokwasy na C-końcu białka HC-Pro.

W badaniach nad zróżnicowaniem genomu, Moury i in. (2002) badali współczynnik ω , przedstawiający stosunek substytucji niesynonimicznych, do substytucji synonimicznych, który obrazuje prawdopodobną presję selekcyjną na poziomie białka. Jeżeli $\omega > 1$, oznacza to, że mutacja niesynonimiczna zapewnia przydatną przewagę w stosunku do białka bez tej mutacji lub z mutacją synonimiczną (selekcja pozytywna). Jeżeli wartości ω są bliskie zeru, oznacza to, że białko jest szczególnie konserwowane ewolucyjnie na poziomie sekwencji aminokwasowej. Kiedy współczynnik $\omega = 1$, oznacza to neutralne znaczenie dla ewolucji. Odnaleziono jedną pozycję – 14, w sekwencji aminokwasowej białka 6K2 wykazującą $\omega > 1$, oraz 24 takie pozycje w obrębie białka CP (Moury i in., 2002). Wyniki badań prowadzonych przez autora tej rozprawy, również pokazują w pozycji 14 białka 6K2 mutację względem użytego izolatu referencyjnego, gdzie nastąpiła substytucja z izoleucyny (I) na treoninę (T) we wszystkich badanych izolatach. Ponadto substytucję z asparaginy (N) na lizynę (K) zidentyfikowano w pozycji 16 tego białka – również we wszystkich badanych izolatach wirusa. Świadczy to o ewolucyjnej selekcji pozytywnej. W przypadku innych potywirusów takie mutacje odnajdywano również w białku płaszczu, szczególnie na N-końcu, który jest wyeksponowany na zewnątrz cząstki wirusa. Niektóre z tych pozycji aminokwasowych występowały w wirusach z rodzaju *Potyvirus*: PVY, BYMV (ang. *Bean yellow mosaic virus*), YMV (ang. *Yam mosaic virus*) (Moury i in., 2002). W badaniach autora nagromadzenie mutacji również obserwowano głównie na N-końcu białka CP (rys.54).

W USA podejmowano próby rozróżniania izolatów północno-amerykańskich od europejskich na podstawie różnic w sekwencji nukleotydowej genu P1, przy użyciu specyficznego startera reakcji PCR (S2). Starter o długości 19 nukleotydów posiadał w pozycji 15 różnicującą zasadę komplementarną do odpowiedniego nukleotydu w obrębie genomu wirusa (Nie i Singh, 2002). Sekwencja startera została dobrana na podstawie 11 dostępnych wówczas sekwencji genu P1. Izolaty północno-amerykańskie w tej pozycji posiadały adeninę (A), podczas gdy europejskie guaninę (G). Odnosząc to do izolatów wirusa omawianych w niniejszej rozprawie, można przypuszczać, że wykorzystując ten starter izolat niemiecki (PVY 8) i polski (PVY 9), a więc izolaty europejskie byłyby kwalifikowane jako północno-amerykańskie, ponieważ w komplementarnej dla tego startera pozycji zawierały one adeninę (A).

W niniejszej pracy przedstawiono propozycje klasyfikacji izolatów PVY na podstawie 82 pełnych sekwencji genomowych pozyskanych z GenBanku i 15 badanych przez autora.

Skonstruowane dwa drzewa filogenetyczne niezależnymi metodami UPGMA (rys. 55) i Neighbor-Joining (rys. 56) prezentowały zbliżone wyniki. Izolaty poddane analizie filogenetycznej utworzyły klastry: PVY^{NW}, PVY^O, PVY^{NTN} i PVY^{N/NTN}, co świadczy o istnieniu kilku genotypów w światowej populacji wirusa. Ponadto izolaty pochodzące z pomidora, papryki oraz stary izolat tytoniowy MN, utworzyły odległy ewolucyjnie od pozostałych izolatów klaster, w obrębie którego, udało się wyróżnić mały klaster PVY^C. Izolaty PVY badane przez autora zostały umiejscowione odpowiednio do genotypu, w dwóch klastrach: PVY^{NW} i PVY^{NTN}. Warto tu jednak zauważyć, że izolaty PVY 9 i PVY 15, były ze sobą bliżej spokrewnione w stosunku do pozostałych badanych izolatów i na drzewach filogenetycznych zostały wyodrębnione, w małym podklastrze. Niemal wszystkie badane izolaty zostały zaklasyfikowane do odpowiednich klastrów zgodnie z ich charakterystyką serologiczną. Wyjątkiem są tutaj izolaty PVY 8 i PVY 9, które mimo, że posiadały serotyp PVY^O, znalazły się w klastrze PVY^{NTN}. Powodem była opisana wyżej mutacja punktowa, w obrębie białka płaszczka, zmieniająca epitop rozpoznawany przez przeciwciała monoklonalne anti-PVY-N.

W grupie izolatów PVY^{NW}, wykazano bardzo wysokie podobieństwo badanego izolatu PVY 14 do północno-amerykańskich izolatów PVY^{N:O} oraz izolatu PVY 7 do izolatu Wilga 261-4 i PVY^O-LW, opisanego przez Schuberta i in. (2007). Podobieństwo sekwencji izolatu PVY 14 do północno-amerykańskiego L56 opisanego przez Nie i in. (2004) wyniosło 99,1 %. Stopień identyczności sekwencji między PVY 7, a PVY^OLW i Wilga 261-4 wyniósł odpowiednio 98 % i 99%, a pomiędzy izolatami PVY^OLW i Wilga 261-4 – 97,9 %,.. Podobieństwo izolatu PVY 7 do PVY^O-LW jest zastanawiające, ponieważ PVY 7 należy do grupy PVY^{NW}, podczas gdy ten drugi uznany jest za należący do szczepu PVY^O (Chachulska i in., 1997a). Jednak w badaniach Chachulskiej i in. (1997a) i Tordo i in. (1995), na drzewie filogenetycznym zbudowanym w oparciu o sekwencję aminokwasową białka płaszczka był on również grupowany w jednym klastrze z izolatem PVY^N-Wi. Sugeruje to, że PVY^O-LW może być rekombinantem pomiędzy szczepem PVY^O i PVY^N, co zresztą potwierdziła analiza rekombinacji przeprowadzona przez autora (rys. 57).

W grupie izolatów PVY^{NTN}, dwa z nich PVY 9 i PVY 15, wykazują większe ewolucyjnie pokrewieństwo w stosunku do brytyjskiego v942490 i północno-amerykańskich 423-3, HR-1, L26 i N4 (Hu i in., 2009), niż do pozostałych badanych przez autora polskich izolatów. Podobieństwo sekwencji izolatu PVY 15 do sekwencji izolatu brytyjskiego v942490 i północno-amerykańskiego 423-4 wyniosło odpowiednio 99,8 % i 99,7 %, podczas gdy do polskiego PVY 4 – 99,6 %.

Podobieństwo badanych izolatów, zarówno z grupy PVY^{NW} jak i z PVY^{NTN}, do wybranych izolatów północno-amerykańskich jest bardzo duże. Szczególnie do tych uwzględnionych w pracach Nie i Singh (2002), którzy badali możliwość rozróżniania europejskich i amerykańskich izolatów na podstawie ich sekwencji. Izolaty przez nich badane utworzyły na drzewach filogenetycznych dwa klastry. Jeden, zawierający izolaty europejskie i drugi w skład którego wchodziły izolaty pochodzące z USA. Podobieństwo sekwencji w obrębie klastra wynosiło 98%, podczas gdy pomiędzy klastrami zaledwie 90%. Zupełnie odmienne wyniki uzyskali Lorenzen i in. (2006), którzy porównywali sekwencje izolatów PVY pochodzących z Europy, USA i Kanady. Północno-amerykańskie izolaty PVY^N i PVY^{NTN} miały w 99 % identyczną sekwencję z izolatami europejskimi. Natomiast izolaty PVY^{N:O} były w 99,5 % identyczne z izolatami europejskimi PVY^{NW}. Było to potwierdzeniem faktu, że europejskie warianty szczepów pojawiły się w USA.

W badaniach podjęto również próby porównania badanych przez autora zrekombinowanych form wirusa – izolatu PVY 14 należącego do PVY^{NW} i PVY 15 należącego do PVY^{NTN}, z formami niezrekombinowanymi – PVY^O139 (CS434577) i PVY^N605 (X97895; Schubert i in, 2007). Podobieństwo sekwencji izolatu PVY 14 do niezrekombinowanego PVY^O139 i PVY^N605, wyniosło odpowiednio 92,7 % i 88,2 %, zaś PVY15 do PVY^N605 i PVY^O139 wyniosło 93,5% i 88,1 %. Porównano również podobieństwo sekwencji badanych przez autora izolatów w obrębie grup PVY^{NW} i PVY^{NTN} oraz między nimi. Najbardziej zbliżone sekwencje pomiędzy grupami wykazano dla izolatów PVY 4 i PVY 14, największe różnice wykazano pomiędzy sekwencjami PVY 7, a PVY 9 i wynosiły one odpowiednio 94 % i 92,2 %. W obrębie tego samego klastra najbardziej różniły się między sobą sekwencje izolatów – wśród PVY^{NW}: PVY 14 i PVY 6, a wśród PVY^{NTN}: PVY 9 i PVY 11, zaś ich podobieństwo wynosiło odpowiednio 97,3 % i 99,4 %. Powyższe dane sugerują, że zmienność sekwencji wśród izolatów należących do PVY^{NW} jest większa, niż izolatów PVY^{NTN}. Warto w tym miejscu również wspomnieć o małej grupie izolatów nekrotycznych m.in. egipskim N-Egypt i francuskim PVYn w obrębie klastra PVY^O. Uległy one rekombinacji i posiadają dwie bardzo małe wstawki typu PVY^N, w obrębie 3'-końca genu N1b oraz regionu 3'NTR. Pozostała część genomu jest typu PVY^O, dlatego też zostały one zaliczone do klastra PVY^O (Ogawa i in., 2008).

5.6. Rekombinacje

Analiza przetasowania sekwencji genomowych dziewięćdziesięciu siedmiu izolatów, w tym piętnastu własnych, z wykorzystaniem pakietu RDP pozwoliła autorowi na

stwierdzenie, że w obrębie gatunku PVY, rekombinacja jest zjawiskiem bardzo częstym. Na 97 analizowanych sekwencji genomowych, 95 stanowiły rekombinanty, a jedynie u dwóch nie stwierdzono tego zjawiska: Adgen i Chile 3.

Wszystkie badane przez autora izolaty należące do grupy PVY^{NTN} wykazywały identyczny wzór rekombinacyjny, tzn., we wszystkich izolatach miejsca rekombinacji były identyczne. Sekwencja pierwszych 2417 nukleotydów jest zbliżona do sekwencji izolatu New Zeland (AM268435; Schubert i in., 2007) i wykazuje 99,1 % podobieństwa sekwencji nukleotydowej, od pozycji 2418, następuje przełączenie do sekwencji typowej dla szczepu O, następnie w pozycji 5820 następuje kolejne przełączenie do sekwencji typowej dla szczepu PVY^N. Jako izolat rodzicielski wskazano tu izolat PVY^N605, który wykazuje podobieństwo sekwencji równe 99,4 %. W pozycji 9173 wykryto kolejne przełączenie do sekwencji typowej dla PVY^O, a w pozycji 9661 kolejne przełączenie do sekwencji podobnej do izolatu New Zeland – 91,1%.

Wśród badanych izolatów PVY^{NW}, obserwowano trzy niezależne wzory rekombinacyjne. Pierwszy występujący u izolatów: PVY 2, PVY 3, PVY 5, PVY 6, PVY 10 i PVY 12. Na końcu 5' znajduje się sekwencja typowa dla szczepu PVY^O, następnie pomiędzy pozycjami 57, a 493 zidentyfikowano sekwencję zbliżoną do izolatu SASA-110 – 98,2% podobieństwa sekwencji, ale wciąż reprezentuje ona sekwencję typową dla szczepu PVY^O. W pozycji 494 następuje przełączenie sekwencji na typową dla PVY^N, zbliżoną do izolatu New Zeland. W pozycji 2386 zlokalizowano kolejne miejsce rekombinacji, w którym następuje przełączenie z powrotem na sekwencję typową dla PVY^O. Nieco inny wzór rekombinacyjny prezentuje izolat PVY 7. Pierwsze miejsce rekombinacji zidentyfikowano w pozycji 57, gdzie następuje wymiana sekwencji na zbliżoną do tej z izolatu SASA-110, ale wciąż będącą typu PVY^O, która kończy się drugim miejscem rekombinacji w pozycji 671. Następnie od pozycji 687 następuje zmiana charakteru sekwencji na PVY^N zbliżoną do izolatu New Zeland i zgodną z nią w 99,2 %. W pozycji 2386 następuje powrót do sekwencji typowej dla PVY^O. Izolat PVY 14 wykazuje jeszcze inny wzór rekombinacyjny. Od końca 5' do pozycji 2321 posiada wstawkę o sekwencji zbliżonej do izolatu New Zeland, po czym następowało przełączenie na sekwencje typową dla PVY^O. Przy końcu 3' zidentyfikowano jeszcze jedno miejsce rekombinacji, gdzie w pozycji 9660 następuje przełączenie do sekwencji typowej dla PVY^N. Wśród analizowanych sekwencji często pojawiały się tzw. nieznanne wstawki (ang. unknown), dla których nie odnaleziono podobnych sekwencji rodzicielskich wśród użytych do analiz 97 pełnych sekwencji genomowych lub wstawki, dla których program RDP nie był w stanie określić pozycji jej końca. Z uwagi na bardzo dużą ilość użytych do obliczeń

sekwencji, można przypuszczać, że może to być wynikiem tzw. szumu zdarzeń rekombinacyjnych (Martin i Rybicki, 2000; Kim i in., 2009). Sekwencje badane przez autora, posiadały miejsca rekombinacji zbliżone do już wcześniej opisywanych izolatów syryjskich (Chikh i in., 2010). Miejsca rekombinacji w pozycjach 2417 i 5820, w obrębie genów P3 i NIa (VPg) badanych izolatów PVY^{NTN}, są zbliżone do miejsc rekombinacji wśród syryjskich izolatów z grupy Syr-I i Syr-II – tu pozycje odpowiednio 2414 i 5833. Pozycja 9173 w obrębie genu CP, była podobna do tych występujących w europejskich izolatach badanych przez Glais i wsp. (2002). Tam również następowało przełączenie z sekwencji typowej dla PVY^N na sekwencję PVY^O. Z tym, że w badanych przez autora izolatach PVY^{NTN}, w pozycji 9661 w obrębie regionu nie ulegającego translacji 3'NTR, następowało kolejne przełączenie na sekwencję typową dla izolatów nekrotycznych PVY^N, podobnie jak w izolacie Egypt-N i PVYn (Abdel i in., 2003, AF522296; Robaglia i in., 1989, D00441). Pozycja 493 w obrębie genu P1 u badanych izolatów PVY^{NW}, była zbliżona do obserwowanej przez Glais i wsp. (2002) pozycji 499-500 i pozycji 500 w północno-amerykańskim izolacie PN10A sklasyfikowanym jako PVY^{N:O} –(Lorenzen i in., 2008), w których następowało przełączenie z sekwencji typowej dla PVY^O na PVY^N. Typowymi miejscami rekombinacji wśród izolatów z grupy PVY^{NW} jest 3' koniec genu HC-Pro. U badanych izolatów takie miejsca rekombinacji znajdowały się w pozycji 2386 i 2321. W tym samym regionie stwierdzono rekombinacje u: europejskich izolatów PVY^{NW}, amerykańskich ID-1, OR-1, PN10A i syryjskich izolatach z grupy Syr-I i Syr-II oraz syryjskim izolacie PVY-12 w pozycjach odpowiednio 2414-2418, 2396-2412 i 2414. Obserwowane niewielkie przesunięcia w lokalizacjach miejsc restrykcyjnych można tłumaczyć niską presją selekcyjną na te miejsca w genomie wirusa (Chikh i in., 2010). Wśród badanych przez autora izolatów należących do PVY^{NW} za wyjątkiem izolatu PVY 14, wskazano pozycję 57 jako miejsce rekombinacji, które nigdy wcześniej nie było opisywane w literaturze.

Warto zauważyć, że region obejmujący geny P3 (u PVY^{NTN} z wyłączeniem 10 początkowych nukleotydów), 6K1, CI, 6K2 i VPg (u PVY^{NTN} – 5'-końcową część genu) jest u wszystkich badanych przez autora izolatów typu PVY^O, podobnie jak u izolatów północno-amerykańskich badanych przez Hu i wsp. (2009).

Rozmieszczenie miejsc rekombinacji najprawdopodobniej nie jest przypadkowe. Przypuszcza się, że zjawisko rekombinacji może być wynikiem wewnętrznych cech cząstek RNA wirusowego, takich jak obecność regionów bogatych w sekwencje AU, w RNA dawcy i biorcy jak w przypadku wirusa mozaiki stokłosa (BMV) (ang. *Brome mosaic virus*) (Nagy i Bujarski, 1997). Zostało to zresztą potwierdzone dla miejsc rekombinacji w pobliżu pozycji

2395 i 5840 u PVY (Hu i in., 2009a). Innym warunkiem zajścia zjawiska rekombinacji jest koinfekcja rośliny przez dwa rodzicielskie szczepy (Bousalem i in., 2000). Nie jest więc zaskoczeniem, że zjawisko rekombinacji u PVY może powodować tworzenie nowych typów izolatów wirusa, takich jak PVY^{NW} i PVY^{NTN}, które przypuszczalnie wykazują korzyści w stosunku do form rodzicielskich (Glais i in., 2002). Ponadto na zajście rekombinacji może mieć wpływ struktura drugorzędowa RNA, szczególnie zdolność do tworzenia struktur typu „spinki do włosów”, która może być sygnałem do zatrzymania replikazy na matrycy i bezpośrednio sprzyjać rekombinacji RNA przez przyłączenie zatrzymanej replikazy do kompleksu nowo tworzonych nici podczas zjawiska *crossover* (Nagy i Simon, 1997a). Poza wspomnianymi wyżej czynnikami, które wpływają na wystąpienie zdarzeń rekombinacyjnych, przypuszczalnie istnieją inne – dotąd nierozpoznane, takie jak roślina gospodarza, czy ograniczenia w selekcji ekologicznej (Hu i in, 2009).

6. Podsumowanie i wnioski

1. Tempo pojawiania się objawów PVY w warunkach naturalnej presji infekcyjnej było zróżnicowane i zależne od odmiany tytoniu oraz warunków pogodowych panujących w danym roku. Najniższe tempo obserwowano w 2006 roku, a najwyższe w 2008 r.
2. Poziom infekcji odmian podatnych był zróżnicowany; największej infekcji ulegała odmiana Kentucky 17, zaś najslabiej infekowana była odmiana Habana 92, we wszystkich badanych latach. W badanym okresie stwierdzono też wzrost udziału porażonych roślin od 27% w 2006 r. do 90,7% w 2008 r.
3. Regionem o największym nasileniu infekcji odmian podatnych był Jędrzejów. Średni udział zainfekowanych roślin tytoniu w latach 2006-2008 wyniósł tu 69,8% i był istotnie wyższy od poziomu porażenia w pozostałych regionach. Najniższy średni stopień infekcji obserwowano w Grudziądzu – 35,7%.
4. Infekcje PVY odmian odpornych w warunkach polowych były niskie; średni udział roślin porażonych w badanym okresie nie przekroczył 0,6%. Najwyższy udział chorych roślin stwierdzono u odmiany Virginia SCR (2,5%), natomiast nie uległa infekcji odmiana VAM. Nie stwierdzono istotnej różnicy w nasileniu infekcji odmian odpornych pomiędzy regionami. Pomimo niewielkiej liczby porażonych roślin widoczny jest stały wzrost infekcji w tej grupie odmian.
5. Warunki pogodowe miały istotny wpływ na nasilenie PVY w Polsce. Wykazano, że niższa temperatura w okresie wegetacyjnym sprzyja rozwojowi choroby, natomiast długo utrzymująca się średnia temperatura powyżej 20°C jest skorelowana z niskim poziomem infekcji tytoniu.
6. Procentowy udział izolatów PVY z grupy PVY^{NW} i PVY^{NTN} jest zróżnicowany i zależny od regionu. Najwyższy udział PVY^{NW} obserwowano w Grudziądzu i Augustowie. Niezależnie od regionu obserwowany jest natomiast ciągły wzrost udziału izolatów wirusa z grupy PVY^{NTN}.

7. Udział izolatów PVY zdolnych do przełamania odporności tytoniu był zróżnicowany w poszczególnych regionach. Najwięcej izolatów przełamujących odporność pochodziło z Jędrzejowa. Stwierdzono też wyższy udział izolatów przełamujących odporność typu *va* wśród grupy PVY^{NTN} (21%) niż wśród PVY^{NW} (5,6%).
8. Analiza wzorów restrykcyjnych oraz skonstruowanych na ich podstawie drzew filogenetycznych wykazała, że najlepsze rezultaty w odniesieniu do grupowania izolatów PVY na poszczególne serotypy uzyskano po zastosowaniu nukleazy Sdu I.
9. Na podstawie otrzymanej sekwencji aminokwasowej 15 pełnych genomów PVY wskazano i scharakteryzowano pozycje w białku VPg (101 i 105), w których mutacje prowadzą do uzyskania przez wirusa zdolności do przełamania odporności odmian VAM i Wiślica.
10. W sekwencjach aminokwasowych wskazano pozycje różnicujące badane izolaty na PVY^{NW} i PVY^{NTN}. Ponadto w obrębie sekwencji aminokwasowej białka płaszczka (CP) wskazano pozycje 12 i 28 jako prawdopodobnie wchodzące w skład epitopu wirusa.
11. Na podstawie przeprowadzonej analizy wykazano, że wszystkie poddane sekwencjonowaniu izolaty posiadają zrekombinowany genom.

7. Literatura

1. Abdel El-Mohsen N.M.A., Gamal El-Dinn A.S., Sohair I.E.A., Sadik A.S., Abdelmaksoud H.M.: Characterization of potato virus Y strain N-Egypt. 2003, *Ann. Agric. Sci.*, 48(2):485-504.
2. Abdullah-Razzak A., Guiraud T., Peypelut M., Walter J., Houvenaghel M.C., Candresse T.: Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against lettuce mosaic potyvirus. 2009, *Mol. Plant Pathol.*, 10:109-113.
3. Acosta-Leal R., Mc Daniel R., Xiong Z.: Resistance of tobacco Virgin A mutant (VAM) to potyvirus accumulation and systemic translocation is conditioned by two independent genes. 1998, *Phytopathology*, 89:8.
4. Acosta-Leal R., Xiong Z.: Complementary functions of two recessive R-genes determine resistance durability of tobacco 'Virgin A Mutant' (VAM) to potato virus Y., 2008, *Virology*, 379:275-283.
5. Agindotan B.O., Shiel P.J., Berger P.H.: Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real-time RT-PCR. 2007, *J. Virol. Methods*, 142:1-9.
6. Al-Ani R. A., Diwan S.N.H., Adhab M.A.: Systemic resistance induced in potato plants against Potato virus Y common strain (PVY⁰) by plant extract in Iraq. 2011, *Adv. Environ. Biol.*, 5(2):375-380.
7. Anandalakshmi R., Marathe R., Ge X., Herr J.M., Mau C., Mallory A., Pruss G., Bowman L., Vance V.B.: A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. 2000, *Science*, 290:142-144.
8. Ano G., Blancard D., Cailleteau B.: Mise au point sur la resistance recessive aux souches necrotiques du virus Y de la pomme de terre (PVY) presente chez *Nicotiana*. 1995, *Ann. Tabac.*, 2(27):35-42.
9. Aramburu J., Galipienso L., Matas M.: Characterization of potato isolates from tomato crops in northeast Spain. 2006, *Eur. J. Plant Pathol.*, 115:247-258.
10. Aranda M.A., Fraile A., Garcia-Arenal F., Malpica J.M.: Contribution of mutation and RNA recombination to the evolution of a plant pathogenic RNA. 1997, *J. Mol. Evol.*, 44:81-88.
11. Arcia-Montezuma M.A.: Sources of resistance in tobacco to potato virus Y and their mode of inheritance. 1979, Thesis, North Carolina State Univ., Raleigh, USA, 75.

12. Arenz B, Hunnius W.: Weitere Untersuchungen über die Sortenresistenz gegen verschiedene Y-Virusstammgruppen. 1959, Bayer Landwirtsch Jahrb, 36:163-173.
13. Arbatova J., Lehto K., Pehu E., Pehu T.: Localization of the P1 protein of potato Y potyvirus in association with cytoplasmic inclusion bodies and in the cytoplasm of infected cells. 1998, Journal of General Virology, 79:2319-2323.
14. Arnedo-Arnés M.S., Luis-Arteaga M., Ortega R.G. : New inheritance studies related to potato virus Y (PVY) resistance in *Capsicum annum* L. 'Serrano Criollo de Morelos-334'. 2006, Euphytica, 151:95-101.
15. Atabekov J.G., Taliensky M.E.: Expression of a plant virus-coded transport function by different viral genomes. 1990, Advances in Virus Research, 30:201-248.
16. Athow K.L., Laviolette F.A., Wilcox J.R., Abney T.S.: Registration of TN 86 burley tobacco. 1987, Crop. Sci. 27:365-366.
17. Atreya C.D.: Application of genome sequence information in potyvirus taxonomy: an overview. 1992, Arch. Virol. Supplementum 5:17-23.
18. Atreya C.D., Atreya P.L., Thornbury D.W., Pirone T.P.: Site-directed mutations in the potyvirus HC-Pro gene affect helper component activity, virus accumulation and symptom expression in infected tobacco plants. 1992, Virology, 191:106-111
19. Atreya C.D., Pirone T.P.: Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: Effects of amino acid substitutions, deletions and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11919-11923.
20. Atreya P.L., Lopez-Moya J.J., Chu M., Atreya C.D., Pirone T.P.: Mutational analysis of the coat protein N-termina amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. 1995, J. Gen. Virol., 76:265-270.
21. Ayme V., Petit-Pierre J., Souche S., Palloix A., Moury B.: Molecular dissection of the potato virus Y VPg virulence factor reveals complex adaptations to the *pvr2* resistance allelic series in pepper. J. Gen. Virol., 2007, 88:1594-1601.
22. Bagnall R.H., Larson R.H., Walker J.C.: Potato viruses M, S and X in relation to interveinal mosaic of Irish Cobbler variety. 1956, Wisconsin Agr. Expt. Sta. Res. Bull., 198:1-45.
23. Baldauf P.M., Gray S.M., Perry K.L.: Biological and serological properties of potato virus Y isolates in northeastern United States potato. 2005, Plant Disease, 90(5):559-566.

24. Baldauf P.M., Gray S.M., Perry K.L.: Biological and serological properties of potato virus Y isolates in Northeastern United States potato. 2006, *Plant Dis.*, 90:559-566.
25. Balme-Sinibaldi V., Tribodet M., Croizat F., Lefeuvre P., Kerlan C., Jacquot E. : Improvement of potato virus Y (PVY) detection and quantitation using PVY^N- and PVY^O-specific real-time RT-PCR assays. 2006, *J. Virol. Methods*, 134:261-266.
26. Barker H., Kara D., McGeachy, Toplak N., Gruden K., Žel J., Browning I.: Comparison of genome sequence of PVY isolates with biological properties. 2009, *Am. J. Pot. Res.*, 86:227-238.
27. Barnett O.W.: A summary of potyvirus taxonomy and definitions. 1992, *Arch. Virol. Supplementum*, 5:435-444.
28. Basky Z.: The relationship between aphid dynamics and two prominent potato viruses (PVY and PLRV) in seed potatoes in Hungary. 2002, *Crop Prot.*, 21:823-827.
29. Baunoch D.A., Das P., Hari V.: Potato virus Y helper component protein is associated with amorphous inclusions. 1990, *J. Gen. Virol.*, 71:2479-2482.
30. Bawden F.: Studies on a virus causing foliar necrosis of the potato. 1934, *Proc. Royal Soc. (London) Ser. B*, 116:375-395.
31. Bawden F.: The viruses causing top necrosis (acronecrosis) of the potato. 1936, *Ann. Appl. Biol.*, 23:487-497.
32. Bawden F., Kassanis B.: Varietal differences in susceptibility to potato virus Y. 1946, *Ann. App. Biol.*, 33:46-50.
33. Beczner L., Horváth J., Romhányi I., Förster H.: Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. 1984, *Potato Res.*, 27:339-352.
34. Berbeć A., Głazewska Z.: Transfer of resistance to potato virus Y from *Nicotiana benavidesii* Goodspeed to *N. tabacum*. 1988, *Gen. Pol.*, 22(2):197-207.
35. Berbeć A.: Morphology, cytogenetics and resistance of amphidiploid of *Nicotiana raimondii* Macbride x *N. tabacum* L. (F1 cv. Zamojska 4 x cv. LB-838) to potato virus Y. 1988, *Gen. Pol.*, 29(1):41-49.
36. Berbeć J.: Wirusowa nekroza (brunatnienie) nerwów liści tytoniu. 1960, *Wiad. Tyton.*, 1(31):237-240.
37. Berger P.: Die Symptomausprägung einiger Virosen auf Tabak unter Freiland und Gewächshausbedingungen. *Berichte des Instituts für Tabakforschung*. 1958, Drezno, 5(1).

38. Bergervoet J.H.W., Peters J., van Beckhoven J.R.C.M., van den Bovenkamp G.W., Jacobson J.W., van der Wolf J.M.: Multiplex microsphere immuno-detection of potato virus Y, X and PLRV. 2008, *J. Virol. Methods*, 149:63-68.
39. Blanc S., Lopez-Moya J.J., Pirone T.P.: La transmission par pucerons du tobacco vein mottling virus nécessite une interaction entre HC-Pro et la protéine de capsid. 1997, *Sixiemes Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France. Résumés*, 48.
40. Blancard D., Ano G., Cailleteau B.: Principaux virus affectant le tabac en France. 1994, *Ann. Tabac*, 26:39-51.
41. Blancard D., Ano G., Cailleteau B. : Etude du pouvoir pathogène d'isolates de PVY sur tabac ; proposition d'une classification intégrant la résistance à la nécrose. 1995, *Ann. Tabac*, 27:43-50.
42. Blanco-Urgoiti B., Sánchez F., Dopazo J., Ponz F. : A strain-type clustering of potato virus Y based on the genetic distance between isolates calculated by RFLP analysis of the amplified coat protein gene. 1996, *Arch. Virol.*, 141 :2425-2442.
43. Blanco-Urgoiti B., Sánchez F., Pérez de San Roman C., Dopazo J., Ponz F. : Potato virus Y group C isolates are homogenous pathotype but two different genetic strains. 1998a, *J. Gen. Virol.*, 79 :2037-2042.
44. Blanco-Urgoiti B., Tribodet M., Leclere S., Ponz F., Pérez de San Román C., Legorburu F.J., Kerlan C. :Characterization of potato potyvirus Y (PVY) isolates from seed potato batches. Situation of the NTNm Wilga and Z isolates. 1998b, *Eur. J. Plant Pathol.*, 104:811-819.
45. Bode O.: Recherches sur le virus de la maladie des cotes brunes du Tabac. 1958, *Bruksela*, 93-96.
46. Boonham N., Barker I. : Strain-specific recombinant antibodies to potato virus Y potyvirus. 1998, *J. Virol. Methods*, 74:193-199.
47. Boonham N., Hims M., Barker I., Spence N.: Potato virus Y from petunia can cause symptoms of potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). 1999, *Eur. J. Plant Pathol.*, 105:617-621.
48. Boonham N., Walsh K., Hims M., North J., Barker I.: Biological and sequence comparisons of potato virus Y isolates associated with potato tuber necrotic ringspot disease. 2002, *Plant Pathol.* 51:117-126.
49. Boukhris-Bouhachem S., Djilani-Khouadja F., Fakhfakh H., Glais L., Tribodet M., Kerlan C.: Incidence and characterization of potato virus Y in seed potatoes in Tunisia. 2010, *Potato Res.*, 53:151-166.

50. Boukhris-Bouhachem S., Rouze-Jouan J., Souissi R., Glais L., Hulle M. : Transmission efficiency of the strain PVY^{NTN} by commonly captured aphids in Tunisian potato fields. 2011, Plant Pathol. J., 10(1):22-28.
51. Bousalem M., Douzery E.J.P., Fargette D.: High genetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of Yam mosaic virus: a contribution to understanding potyvirus evolution. J. Gen. Virol., 81:243-255.
52. Bradley R.H.E.: Studies on the mechanisms of transmission of potato virus Y by the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulz.) (Homoptera: Aphidiae). 1954, Can. J. Entomol., 32:64-73.
53. Brantley J.D., Hunt A.G.: The N-terminal protein of the polyprotein encoded by the potyvirus tobacco vein mottling virus is an RNA-binding protein. 1993, J.Gen. Virol., 74:1157-1162.
54. Browning I., Charlet K., Chrzanowska M., Dėdič P., Kerlan C., Kryszczuk A., Schubert J., Varveri C., Werkman A., Wolf I.: What is PVY^{NTN}? The reaction of potato cultivars to inoculation with a range of PVY isolates. 2004, 12th EAPR Virol. Sec. Meet., Rennes, France, 51-53.
55. Burk L.G., Chaplin J.F., Gooding G.V., Powell N.T.: Quantity production of anther-derived haploids from a multiple disease resistant tobacco hybrid. I. Frequency of plants with resistance or susceptibility to tobacco mosaic virus (TMV), potato virus Y (PVY) and root knot (RK). 1979, Euphytica, 28:201-208.
56. Cadman C.H.: Autotetraploid inheritance in the potato; some new evidence. 1942, J. Genet., 44:3-51.
57. Cardin L., Moury B.: First report of potato virus Y in *Nicotiana mutabilis* in France. Plant Disease, 2008, 92:312
58. Carrington J.C., Dougherty W.G.: Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. 1987, Journal of General Virology, 61:2540-2548.
59. Carrington J.C., Dougherty W.G.: A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:3391-3395.
60. Carrington J.C., Cary S.M., Parks T.D., Dougherty W.G.: A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. 1989, EMBO Journal, 8:365-370.

61. Carrington J.C., Freed D.D.: Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' non translated region. 1990, *Journal of Virology*, 64:1590-1597.
62. Carrington J.C., Herndon K.L.: Characterization of the potyviral HC-Pro autoproteolytic cleavage site. 1992, *Virology*, 187:308-315.
63. Carsten H., Seehofer F.: How Virginia SCR is obtained and cultivated in the Federal Republic of Germany. 1960, *CORESTA*, 3:39-43.
64. Chachulska A.M., Chrzanowska M., Robaglia C., Zagórski W.: Tobacco vein necrosis determinants are unlikely to be located within the 5' and 3' terminal sequences of the potato virus Y genome. *Arch. Virol*, 1997a, 142:765-779.
65. Chachulska A.M., Fakhfakh H., Robaglia C., Granier F., Zagórski W., Vilaine F.: Synthesis of full-length potyvirus cDNA copies suitable for the analysis of genome polymorphism. 1997, *J. Virol. Methods*, 67:189-197.
66. Chaplin J.F., Burk L.G., Gooding G.V., Powell N.T.: Registration of NC 744 tobacco germplasm. 1980, *Crop. Sci.*, 20:677.
67. Chikh A.M., Maoka T., Natsuaki K.T.: A point mutation changes the serotype of potato virus Y isolate; genomic determination of the serotype of PVY strains. 2007a, *Virus Genes*, 35:359-367.
68. Chikh A., Maoka T., Natsuaki K.T.: The occurrence and characterization of new recombinant isolates of PVY displaying shared properties of PVY^{NW} and PVY^{NTN}. 2007b, *J. Phytopathol.*, 155:409-415.
69. Chikh M., Maoka T., Natsuaki K.T.: The occurrence of potato viruses in Syria and the molecular detection and characterization of Syrian potato virus S isolates. 2008, *Potato Res.*, 51:151-161.
70. Chikh A., Maoka T., Natsuaki T., Natsuaki K.T.: PVYNTN-NW, a novel recombinant strain of Potato virus Y predominating in potato fields in Syria. 2010, *Plant Pathol.* 59:31-41.
71. Chrzanowska M.: New isolates of the necrotic strain of potato virus Y (PVY^N) found recently in Poland. 1991, *Potato Res.*, 34:178-182.
72. Chrzanowska M.: Differentiation of potato virus Y (PVY) isolates. 1994, *Phytopatol. Pol.*, 8:15-20.
73. Chrzanowska M., Doroszevska.T.: Comparison between PVY isolates obtained from potato and tobacco plants in Poland. *Phytopathol. Pol.*, 1997, 13:63-71.
74. Cockerham G.: The reactions of the potato varieties to viruses X, A, B and C. 1943, *Ann. Appl. Biol.*, 30:338-344.

75. Coletti K.S., Tattersall E.A., Pyke K.A., Froelich J.E., Stokes K.D., Osteryoung K.W.: A homologue of the bacterial cell division site-determining factor MinD mediates placement of the chloroplast division apparatus. 2000, *Curr. Biol.*, 10:507-516.
76. Cronin S., Verchot J., Haldeman-Cahill R., Schaad M.C., Carrington J.C.: Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. 1995, *The Plant Cell*, 7:549-559.
77. Crosslin J.M., Hamm P.B., Shiel P.J., Hane D.C., Brown C.R., Berger P.H.: Serological and molecular detection of tobacco vein necrosis isolates of potato virus Y (PVY^N) from potatoes grown in the western United States. 2005, *Am. J. Potato Res.*, 82:263-269.
78. Crosslin J.M., Hamm P.B., Hane D.C., Jaeger J., Brown C.R., Shiel P.J., Berger P.H., Thornton R.E.: The occurrence of PVY^O, PVY^N and PVY^{N:O} strains of potato virus Y in certified potato seed lot trials in Washington and Oregon. 2006, *Plant Dis.*, 90:1102-1105.
79. Crute I.R., Pink D.A.C.: Genetics and utilization of pathogen resistance in plants. 1996, *The Plant Cell*, 8:1747-1755.
80. Czubacka A., Doroszewska T.: Estimating agronomic traits of transgenic tobacco lines. 2010, *Euphytica*, 172(1):35-47.
81. De Bokx J.A.: Waardplanten van het aardappel-Y^N-virus. 1961, *T. Pl-ziekten*, 67:333-342.
82. De Bokx J.A., Huttinga H.: Potato virus Y. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, 1981, No.242.
83. DiFonzo C.D.: Epidemiology and control of Potato virus Y (PVY) in the Red River Valley of Minnesota and North Dakota. 1995, Ph.D. thesis. University of Minnesota, St. Paul.
84. Dinkins R., Reddy M.S., Leng M., Collins G.B.: Overexpression of the Arabidopsis thaliana MinD1 gene alters chloroplast size and number in transgenic tobacco plants. 2001, *Planta*, 214:180-188.
85. Dolja V.V., Haldeman R., Robertson N.L., Dougherty W.G., Carrington J.C.: Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. 1994, *EMBO J.*, 13:1482-1491.

86. Dolja V.V., Haldemann-Cahill R., Montgomery A.E., Vandebosch K.A., Carrington J.C.: Capsid proteins determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. 1995, *Virology*, 206:1007-1016.
87. Doroszevska T., Chrzanowska M., Garbaczewska G.: PVY isolates collected from tobacco characterized by serological, biological and cytological methods. 1999, Proc. 10th EAPR Virol. Sec. Meet., Baden, Austria, BFL25/1999:73-83.
88. Doroszevska T.: Krzyżowanie oddalone i transformacja genetyczna w uzyskiwaniu odporności tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) na wirusa Y ziemniaka (PVY). Monografie i rozprawy naukowe, 2004; 9
89. Doroszevska T.: Sub-Group Collaborative Study on Potato Virus Y. Annual Subgroup Report, 2005, CORESTA.
90. Doroszevska T.: Charakterystyka i występowanie wirusa Y ziemniaka (PVY) sprawcy brunatnej nekrozy nerwów tytoniu. Studia i raporty IUNG-PIB, 2008, 13:9-28.
91. Doroszevska T.: Stan aktualny i perspektywy uprawy tytoniu w Polsce. Studia i Raporty IUNG-PIB, 2009, 14:147-160.
92. Doroszevska T.: Transfer of tolerance to different Potato virus Y (PVY) isolates from *Nicotiana africana* Merxm. to *Nicotiana tabacum* L. 2010, *Plant Breeding*, 129(1):76-81.
93. Doroszevska T.: Sub-Group Collaborative Study on Virus Diseases. Annual Subgroup Report 2010, CORESTA CD-ROM ver. No. 31.
94. Doroszevska T., Depta A.: Resistance of wild *Nicotiana* species to different PVY isolates. 2011, *Phytopatologia*, 59:9-24.
95. Dougherty W.G., Parks T.D., Cary S.M., Bazan J.F., Fletterick R.J.: Characterization of the catalytic residues of the tobacco etch virus 49-kDa proteinase. 1989, *Virology*, 172:302-310.
96. Dougherty W.G., Parks T.D.: Post-transcriptional processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. 1991, *Virology*, 183:449-456.
97. Dougherty W.G., Selmer B.L.: Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes. 1993, *Microbiological Reviews*, 57:781-822.

98. Dykstra T.P.: A study of viruses causing yellow mosaics in European and American varieties of the potato, *Solanum tuberosum*. 1939, *Phytopathology*, 29:917-933.
99. Edwardson J.R., Christie R.G., Ko N.J.: Potyvirus cylindrical inclusions – subdivision IV. 1984, *Phytopathol.*, 74:1111-1114.
100. Ellis P., Stace-Smith R., Bowler G., Mackenzie D.J.: Production of monoclonal antibodies for detection and identification of strains of potato virus Y. 1996, *Can. J. Plant Pathol.*, 18:64-70
101. Ellis P., Stace-Smith R., de Villiers G. : Identification and geographic distribution of serotypes of potato virus Y. 1997, *Plant Dis.*, 81:481-484.
102. Espino de Paz A.I., Mendez Perez P., Jordá-Gutiérrez C.: New hosts of potato Y Potyvirus (PVY) identified in the Canary Islands. 1997, *Plant Disease*, 81:1096.
103. Fakhfakh H., Makni M., Robaglia R., Elgaaied A., Marrakchi M.: Polymorphisme des régions capsidique et 3'NTR de 3 isolats tunisiens du virus Y de la pomme de terre (PVY). 1995, *Agronomie*, 15:569-570.
104. Fanigliulo A., Omes S., Pacella R., Harrach B., Martin D.P., Crescenzi A. : Characterization of potato virus Y nnp strain inducing veinal necrosis in pepper: a naturally occurring recombinant strain of PVY. 2005, *Arch. Virol.*, 150:709-720.
105. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A.: *Virus taxonomy. Eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA, 2005, 1259.
106. Fellers J.P., Tremblay D., Handest M.F., Lommel S.A.: The potato virus Y M^{SNR} NIb-replicase is the elicitor of a veinal necrosis-hypersensitive response in root knot nematode resistant tobacco. 2002, *Mol. Plant Pathol.*, 3:145-152.
107. Felsenstein, J. 2004. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
108. Fereres A., Perez P., Gemeno C., Ponz F.: Transmission of Spanish pepper and potato isolates by aphid (Homoptera: Aphididae) vectors: epidemiological implications. 1993, *Environ. Entomol.*, 22:1260-1265.
109. Fereres A.: Barrier crops as a cultural control measure of non-persistently transmitted aphid-borne viruses. 2000, *Virus Research*, 71:221-231.
110. Fereres A., Collar J.L.: Analysis of noncirculative transmission by electrical penetration graphs. *Virus-Insect-Plant interactions.* Academic Press, London, 2001.

111. Flasiński S., Cassidy B.G.: potyvirus aphid transmission requires helper component and homologous coat protein for maximal efficiency. 1998, *Arch. Virol.*, 143:2159-2172.
112. Folwarczna J., Plchová H., Moravec T., Hoffmeisterová H., Dědič P., Čeřovská N.: Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of potato virus Y. 2008, *Folia Microbiol.*, 53:438-442.
113. Gajos Z.: Silnie wirulentny szczep wirusa Y na tytoniu w Polsce, jego występowanie i właściwości w porównaniu ze szczepami nekrotycznym i zwykłym. 1971, *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 115:87-98.
114. Garcia J.A., Riechmann J.L., Lain S.: Proteolytic activity of the plum pox potyvirus NIa-like protein in *E.coli*. 1989, *Virology*, 170:362-369.
115. Gavran M.: Distribution of potato viruses in Yugoslavia. 1997, (*ISHS*) 462:929-934.
116. Gébré-Selassie K., Marchoux G., Delecqle B., Pochard E. : Variabilité naturelle de souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du sud-est de la France. Caractérisation et classification en pathotypes. 1985, *Agronomie*, 5:621-630.
117. Gibbs M.J., Armstrong J.S., Gibbs A.J.: Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. 2000, *Bioinformatics*, 16:573-582.
118. Gillespie J.H. : Episodic evolution of RNA viruses. 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10411-10412.
119. Gingras A.C., Raught B., Sonenberg N.: eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. 1999, *Annu. Rev. Biochem.*, 68:913-963.
120. 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 different biological groups of potato virus Y. *Arch. Virol.*, 1998, 143:2077-2091.
121. Glais L., Tribodet M., Gauthier J.P., Astier-Manifacier S., Robaglia C., Kerlan C. : Restriction endonuclease analysis of the whole potato virus Y (PVY) genome. 1999, *Proc. 10th EAPR Virol. Sec. Meet. BFL 25/1999, Baden. Austria*, 33-37.
122. Glais L., Tribodet M., Kerlan C.: Genomic variability in Potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY^O and PVY^N isolates. *Arch. Virol.*, 2002, 147:363-378.
123. Gooding G.V., Tolin S.A.: Strain of potato virus Y affecting flue-cured tobacco in the southeastern United States. 1973, *Plant Dis. Rep.*, 57:200-204.

124. Gugerli P., Fries P.: Characterization of monoclonal antibodies to potato virus Y and their use for virus detection. 1983, *J. Gen. Virol.*, 64:2471-2477.
125. Gunasinghe U.B., Berger P.H.: Association of potato virus Y gene products with chloroplasts in tobacco. 1991, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 4:452-457.
126. Guo D., Spetz C., Saarma M., Valkonen J.P.: Two potato proteins, including a novel RING finger protein (HIP1), interact with the potyviral multifunctional protein HC-Pro. 2003, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 16:405-410.
127. Gupton C.L., Burk L.G.: Location of the factor for resistance to potato virus Y in tobacco. 1973, *J. Hered.*, 64:289-290.
128. Ha C., Revill P., Harding R.M., Vu M., Dale J.L.: Identification and sequence analysis of potyviruses infecting crops in Vietnam. 2008, *Arch. Virol.*, 153:45-60.
129. Harrington R., Katis N., Gibson R.W.: Field assessment of the relative importance of different aphid species in the transmission of potato virus Y. 1986, *Potato Res.*, 29:67-76.
130. Harrison B.D., Robinson J.D.: Molecular variation in vector-borne plant viruses: epidemiological significance. 1988, *Phil. Trans. R. Soc. Lond., B* 321:447-462.
131. Hong X.Y., Levay K., Murphy J.F., Klein P.G., Shaw J.G., Hunt A.G.: A potyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in yeast cells. 1995, *Virology*, 214:159-166.
132. Hong X.Y., Chen J., Shi Y.H., Chen J.P.: The 6K1 protein of a strain of soybean mosaic virus localizes to the cell periphery. 2007, *Arch. Virol.*, 152:1547-1551.
133. Horváth J.: Studies of strains of potato virus Y. Strain causing brownring of nidribs in tobacco. 1967, *Acta Phytopathol. Hung.*, 2:95-108.
134. Hu X., Meacham T., Ewing L., Gray L.E., Karasev A.V.: A novel recombinant strain of Potato virus Y suggest a new viral genetic determinant of vein necrosis in tobacco. *Virus Research*, 2009, 143:68-76.
135. Hu X., Karasev A.V., Brown C.J., Lorenzen J.H.: Sequence characteristics of potato virus Y recombinants. 2009a, *J. Gen. Virol.*, 90:3033-3041.
136. Hutton E.M.: The relationship between necrosis and resistance to virus Y in the potato. Some genetical aspects. 1945, *J. Com. Sci. Industr. Res. Aust.*, 18:219-224.
137. Ianelli D., D'Apice L., Cottone C., Viscardi M., Scala F., Zoina A., Del Sorbo G., Spigno P., Capparelli R.: Simultaneous detection of cucumber mosaic virus, tomato mosaic virus and potato virus Y by flow cytometry. 1997, *J. Virol. Methods*, 69:137-145.

138. Jacquot E., Tribodet M., Croizat F., Balme-Sinibaldi V., Kerlan C.: A single nucleotide polymorphism-based technique for specific characterization of Y^O and Y^N isolates of Potato virus Y (PVY). *J. Virol. Methods*, 2005, 125:83-93.
139. Jakab G., Droz E., Brigneti G., Baulcombe D., Malnoe P.: Infectious in vivo and in vitro transcripts from a full-length cDNA clone of PVY-N605, a Swiss necrotic isolate of potato virus Y. 1997, *J. Gen. Virol.*, 78:3141-3145.
140. Janzac B., Montarry J., Palloix A., Navaud O., Moury B.: A point mutation in the polymerase of Potato virus Y confers virulence towards the pvr4 resistance of pepper and a high competitiveness cost in susceptible cultivar. 2010, *Mol. Plant Microbe Interact.*, 23:823-830.
141. Jin Y., Ma D., Dong J., Li D., Deng C., Jin J., Wang T.: The HC-Pro protein of potato virus Y interacts with NtMinD of tobacco. 2007, *MPMI*, 20(12):1505-1511.
142. Johansen I.E., Lund O.S., Hjulsager C.K., Laursen J.: Recessive resistance in *Pisum sativum* and Potyvirus pathotype resolved in a gene-for-cistron correspondence between host and virus. 2001, *J. Virol.*, 75:6609-6614.
143. Jones R.A.C.: Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. 1990, *Ann. Appl. Biol.*, 117:93-105.
144. Kahn R.P., Monroe R.O.: Detection of the tobacco veinal necrosis strain of the potato virus Y in *Solanum cardenasii* and *S. andigenum* introduced into the United States. 1963, *Phytopathology*, 53:1356-1359.
145. Kaliciak A., Syller J.: New hosts of Potato virus Y (PVY) among common wild plants in Europe. 2009, *Eur. J. Plant Pathol.*, 124:707-713.
146. Kanavaki O.M., Margaritopoulos J.T., Katis N.I., Skouras P., Tsitsipis J.A.: Transmission of Potato virus Y in tobacco plants by *Myzus persicae nicotianae* and *M. persicae* s. str. 2006, *Plant Dis.*, 90:777-782.
147. Kang B.C., Yeam I., Jahn M.M., Genetic of plant virus resistance. 2005, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43:581-621.
148. Karasev A.V., Nikolaeva O.V., Hu X., Sielaff Z., Whitworth J., Lorenzen J., Gray S.M.: Serological, properties of ordinary and necrotic isolates of potato virus Y: a case study of PVY^N misidentification. 2009, *Am. J. Pot. Res.*, 87:1-9.
149. Kasschau K.D., Carrington J.C.: Requirement for HC-Pro processing during genome amplification of tobacco etch virus. 1995, *Virology*, 209:268-273.
150. Katis N., Gibson R.W.: Transmission of potato virus Y by cereal aphids. 1985, *Potato Res.*, 28:65-70.

151. Keller E.R., Münster J.: Betrachtungen über den Y-virusbefall der nach der Schweiz gelieferten Saatkartoffeln aus europäischen Ländern und die ergriffenen Gegenmassnahmen. 1961, *Eur. Potato J.*, 4:341-353.
152. Kerlan C., Le Romancer M.: Potato tuber necrotic ringspot disease. 1992, *Proc. EAPR Meeting, Virology Section, Vitoria-Gasteiz, Spain*, 77-79.
153. Kerlan C., Tribodet M., Glais L., Gillet M.: Variability of potato virus Y in potato crops in France. 1999, *J. Phytopathol.*, 147:643-651.
154. Khatchikian D., Orlich M., Rott R.: Increased viral pathogenicity after insertion of 28S ribosomal RNA sequence into the hemagglutinin gene of an influenza virus. 1989, *Nature*, 340:156-157.
155. Kim H. K., Luo Y., Moon H. J., Park S. J., Keum H. O., Rho S., Park B. K.: Phylogenetic and recombination analysis of genomic sequences of PCV2 isolated in Korea. 2009, *Virus Genes*, 39:352-358.
156. Kirchner S.M., Hiltunen L., Virtanen E., Döring T.F., Valkonen J.P.T.: Potato virus Y transmitting aphids in a Finnish seed potato area. 2009, 8th International symposium on aphids, Catania (Italy), 8-12 czerwca.
157. Klein P.G., Klein R.R., Rodriguez-Cerezo E., Hunt A.G., Shaw J.G.: Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. 1994, *Virology*, 204:759-769.
158. Koch K.: The potato rugose mosaic complex. 1931, *Science*, 73:615.
159. Koelle G.: Genetische analyse einer Y-virus (Rippenbräune) resistenten mutante der tabaksorte Virgin A. 1961, *Züchter*, 31:71-72.
160. Kogovšek P., Gow L., Pompe-Novak M., Gruden K., Foster G.D., Boonham N., Ravnikar M.: Single-step RT realtime PCR for sensitive detection and discrimination of Potato virus Y isolates. *J. Virol Methods*, 2008, 149:1-11.
161. Koonin E.V.: The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. 1991, *J. Gen. Virol.*, 72:2197-2206.
162. Kovač M., Müller A., Milovanovič J., Milavec M., Düchting P., Ravnikar M.: Multiple hormone analysis indicates involvement of jasmonate signalling in the early defence of potato to potato virus Y^{NTN}. 2009, *Biol. Plantarum*, 53(1):195-199.
163. Köhler E.: Untersuchungen über das K-Virus der kartoffel. 1942, *Angew. Bot.*, 24:118-130.
164. Köhler E.: Die viruskrankheiten der kartoffel nach dem gegenwärtigen stand der forschung. 1960, *Angew. Bot.*, 1:1-27.

165. Kumar S., Nei M., Dudley J., Tamura K.: MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. 2008, *Briefings in bioinformatics*, 9:299-306.
166. Kus M.: The epidemic of the tuber necrotic ringspot strain of potato virus Y (PVY^{NTN}) and its effect on potato crops in Slovenia. 1995, 9th EAPR Virology Section Meeting Bled, 159-160.
167. Kyle M., Palloix A.: Proposed revision of nomenclature for potyvirus resistance genes in Capsicum. 1997, *Euphytica*, 97:183-188.
168. Kyte J. and Doolittle R.F.: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. 1982, *J. Mol. Biol.*: 157:105,.
169. Lacroix Ch., Glais L., Verrier J.L., Jacquot E.: Effect of passage of a potato virus Y isolate on a line of tobacco containing the recessive resistance gene *va*² on the development of isolates capable of overcoming alleles 0 and 2. 2011, *Eur. J. Plant Pathol.*, 130:259-269.
170. Lai M.M.: RNA recombination in animal and plant viruses. 1992, *Microbiol. Rev.*, 56:61-79.
171. Lain S., Riechmann J.L., Garcia J.A.: RNA helicase: a novel activity associated with protein encoded by a positive strand RNA virus. 1990, *Nucleic Acids Res.*, 18:7003-7006.
172. Lain S., Martin M.T., Riechmann J.L., Garcia J.A.: Novel catalytic activity associated with positive strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of a plum pox potyvirus helicase-like protein. 1991, *J. Virol.*, 65:1-6.
173. Legavre T., Maia I.G., Casse-Delbart F., Bernardi F., Robaglia C.: Switches in the mode of transmission select for or against a poorly aphid-transmissible strain of potato virus Y with reduced helper-component and virus accumulation. 1996, *J. Gen. Virol.*, 77:1343-1347.
174. Le Romancer M., Kerlan C.: La maladie des nécroses annulaires superficielles des tubercules ; une affection de la pomme de terre due au virus Y. 1991, *Agronomie*, 11 :889-900.
175. Le Romancer M., Kerlan C., Nedellec M. : Biological characterization of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. 1994, *Plant Pathol.*, 43:138-144.
176. Lewis R.S.: Evaluation of *Nicotiana tabacum* genotypes possessing *Nicotiana africana*-derived genetic tolerance to potato virus Y. 2007, *Crop Sci.*, 47:1975-1984.

177. Li X.H., Valdez P., Olvera R.E., Carrington J.C.: Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). 1997, *J. Virol.*, 71:1598-1607.
178. Li N., Wang X., Zhou G., Dong J.: Molecular variability of the coat protein gene of potato virus Y from tobacco in China. 2006, *Acta Virol.*, 50:107-113.
179. Llave C., Martínez B., Díaz-Ruíz J.R., López-Abella D.: Helper component mutations in nonconserved residues associated with aphid transmission efficiency of a pepper isolate of potato virus Y. 1999, *Phytopathology*, 89:1176-1181.
180. Llave C., Kasschau K.D., Carrington J.C.: Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. 2000, *Proc. Natl. acad. Sci. USA*, 97:13401-13406.
181. Lorenzen J.H., Meacham T., Berger P.H., Shiel P.J., Crosslin J.M., Hamm P.B., Kopp H.: Whole genome characterization of potato virus Y isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada. 2006a, *Arch. Virol.*, 151:1055-1074.
182. Lorenzen J.H., Piche L.M., Gudmestad N.C., Meacham T., Shiel P.: A multiplex PCR assay to characterize potato virus Y isolates and identify strain mixtures. 2006b, *Plant Dis.*, 90:935-940.
183. Lorenzen J., Nolte P., Martin D., Pasche J.S., Gudmestad N.C.: NE-11 represents a new strain variant class of potato virus Y. 2008, *Arch. Virol.*, 153:517-525.
184. Mahajan S., Dolja V., Carrington J.C.: Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: requirements for the translation process and a cis-active element. 1996, *J. Virol.*, 70:4370-4379.
185. Maia I.G., Bernardi F.: Nucleic acid-binding properties of a bacterially expressed potato virus Y helper component-proteinase. 1996, *J. Gen. Virol.*, 77:869-877.
186. Maia I.G., Haenni H.L., Bernardi F.: Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. 1996, *J. Gen. Virol.*, 77:1335-1341.
187. Maple J., Møller S.G.: Plastid division: evolution, mechanism and complexity. 2007, *Ann. Bot.*, 99:565-579.
188. Martin D., Rybicki E.: RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. 2000, *Bioinformatics*, 16:562-563.
189. Martin D.P., Williamson C., Posada D.: RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. 2005a, *Bioinformatics*, 21: 260-262.

190. Martin M.T., Cervera M.T., García J.A., Bonay P.: Properties of the active plum pox potyvirus RNA polymerase complex in defined glycerol gradient fractions, 1995, *Virus Research*, 37:127-137.
191. Masuta C., Nishimura M., Morishita H., Hataya T.: A single amino acid change in viral genome-associated protein of potato virus Y correlates with resistance breaking in 'Virgin A Mutant' tobacco. 1999, *Phytopathol.*, 89:118-123.
192. Maule A., Leh V., Lederer C.: The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. 2002, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5:1-6.
193. Mazier M., Levis C., Chaybani R., Astier-Manifacier S., Tourneur J., Robaglia C. : Enhancement of translational activity mediated by a potyviral 5' untranslated sequence *in vivo* but not *in vitro*. 1994, *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie*, 317:1065-1072.
194. McDonald J.G., Singh R.P.: Assessment of North American isolates of PVY^N for strains that induce tuber necrotic ring necrosis disease. 1993, *Am. Potato J.*, 70:827.
195. McDonald J.G., Kristjansson G.T.: Properties of strains of potato virus Y^N in North America. 1993, *Plant Dis.*, 77:87-89.
196. McDonald J.G., Singh R.P.: Host range, symptomology and serology of isolates of potato virus Y (PVY) that shared properties with both the PVY^N and PVY^O strain groups. 1996, *Am. Potato. J.*, 73:309-315.
197. Merits A., Guo D., Saarma M.: VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence unspecific manner. 1998, *J. Gen. Virol.*, 79:3123-3127.
198. Merits A., Guo D., Järvekülg L., Saarma M.: Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. 1999, *Virology*, 263:15-22.
199. Merits A., Rajamäki M.L., Lindholm P., Runeberg-Roos P., Kekarainen T., Puustinen P., Mäkeläinen K., Valkonen J.P.T., Saarma M.: Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. 2002, *J. Gen. Virol.*, 83: 1211-1221.
200. Morel C., Gognalons P., Guilbaud L., Caranta C., Gébré-Sélassié K., Marchoux G.: Biological and molecular characterization of two tomato strains of potato virus Y (PVY). *Acta Physiologiae Plantarum*, 2000, 22;3:336:343.

201. Moury B., Orel C., Johansen E., Jacquemond M.: Evidence for diversifying selection in potato virus Y and in the coat protein of other potyviruses. 2002, *J. General Virol.*, 83:2563-2573.
202. Moury B., Morel C., Johansen E., Guilbaud L., Souche S., Ayme V., Caranta C., Palloix A., Jacquemond M.: Mutations in potato virus Y genome-linked protein determine virulence towards recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. 2004, *Mol. Plant Microbe Interact.*, 17:322-329.
203. Moury Benoit: A new lineage sheds light on the evolutionary history of Potato virus Y. 2010, *Mol. Plant Pathol.*, 11(1):161-168.
204. Mukherjee K., Verma Y., Chakrabarti S.K., Khurana S.M.P.: Phylogenetic analysis of 5'-UTR and P1 protein of Indian common strain of potato virus Y reveals its possible introduction in India. 2004, *Virus Gen.*, 29:229-237.
205. Murphy P.A., Mackay R.: The compound nature of crinkle and its production by means of a mixture of viruses. 1932, *Sci Proc. Royal Dublin Soc.*, 5:227-247.
206. Murphy J.F., Rhoads R.E., Hunt A.G., Shaw J.G.: The VPg of tobacco etch virus RNA is the 49 kDa proteinase or the N-terminal 24 kDa part of the proteinase. 1990, *Virology*, 178:285-288.
207. Murphy J.F., Rychlik W., Rhoads R.E., Hunt A.G., Shaw J.G.: A tyrosine residue in the small nuclear inclusion protein of tobacco vein mottling virus links the VPg to the viral RNA., 1991, *J. Virol.* 65:511-513.
208. Murphy J.F., Klein P.G., Hunt A.G., Shaw J.G.: Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. 1996, *Virology*, 220:535-538.
209. Nagy P.D., Bujarski J.J.: Engineering of homologous recombination hot spots with AU-rich sequences in Brome mosaic virus. 1997, *J. Virol.*, 71:3799-3810.
210. Nagy P.D., Simon A.E.: New insights into the mechanisms of RNA recombinations. 1997a, *Virol.*, 235:1-9.
211. Nicolas O., Dunnington S.W., Gotow L.F., Pirone T.P., Hellmann G.M.: Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome *va* gene resistance in tobacco. 1997, *Virology*, 237:452-459.
212. Nie X., Singh R.P.: Probable geographical grouping of PVYN and PVYNTN based on sequence variation in P1 and 5'-UTR of PVY genome and methods for differentiating North American PVYNTN. 2002a, *J. Virol. Methods*, 103:145-156.

213. Nie X., Singh R.P.: A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of potato virus Y by uniplex and multiplex RT-PCR. 2002b, *J. Virol. Methods*, 104:41-54.
214. Nie X., Singh R.P.: Specific differentiation of recombinant PVY^{N:O} and PVY^{NTN} isolates by multiplex RT-PCR. *J. Virol. Methods*, 2003a, 113:69-77.
215. Nie X., Singh R.P.: Evolution of North American PVY^{NTN} strain Tu660 from local PVY^N by mutation rather than recombination. 2003b, *Virus Gen.*, 26:39-47.
216. Nie X., Singh R.P., Singh M.: Molecular and pathological characterization of N:O isolates of the potato virus Y from Manitoba, Canada. 2004, *Can. J. Plant Pathol.*, 26:573-583.
217. Nie X.: Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of potato virus Y. 2005, *Plant Dis.*, 89:605-610.
218. Nie X.: Salicylic acid suppresses potato virus Y isolate N:O-induced symptoms in tobacco plants. 2006, *Virology*, 96:255-263.
219. Nienhaus F.: Untersuchungen über infection, vermehrung und nachweis des kartoffel-Y-virus in kartoffelknollen verschiedener sorten. 1960, *Proc. 4th Conf. Potato Virus Disease*, Braunschweig, 99-105.
220. Nieto C., Morales M., Orjeda G., Clepet C., Monfort A., Sturbois B., Puigdomenech P., Pitrat M., Caboche M., Dogimont C., Garcia-Mas J., Aranda M.A., Bendahmane A.: An eIF4E allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. 2006, *Plant J.*, 48:452-462.
221. Noguchi S., Tajima T., Yamamoto Y., Ohno T., Kubo T.: Deletion of a large genome segment in tobacco varieties that are resistant to potato virus Y (PVY). *Mol. Gen. Genet.*, 1999, 262:822-829.
222. Norberga N.R., Silberschmidt K.: On a suspected variant of the potato virus Y (*Solanum virus 2*, Orton), which causes necrosis on tobacco plants. 1944, *Agr. Inst. Biol. St. Paulo*, 15:307-330.
223. Ogawa T., Tomitaka Y., Nakagawa A., Ohshima K.: Genetic structure of a population of potato virus Y inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North American and European populations. 2008, *Virus Res.*, 131:199-212.
224. Oh C.S., Carrington J.C.: Identification of essential residues in potyvirus proteinase HC-Pro by site-directed mutagenesis. 1989, *Virology*, 173:692-724.

225. Orlando A., Silberschmidt K.: Estudos sôbre a transmissao da doenca de Solanaceas „Necroses das Nervuras“, por afídios, e algumas relacoes entre esse virus e o seu principal inseto vetor. 1945, *Arquiv. Instit. Biol.*, 16:133-152.
226. Oshima K., Inoue A.K., Ishikawa Y., Shikata E., Takashi H.: Production and application monoclonal antibodies specific to ordinary strain and necrotic strain of potato virus Y. 1990, *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 56:508-514.
227. Oshima K., Sako K., Hiraishi C., Nakagawa A., Matsuo K., Ogawa T., Shikata E., Sako N.: Potato tuber necrotic ringspot disease occuring in Japan: its association with potato virus Y necrotic strain. 2000, *Plant Dis.*, 84:1109-1115.
228. Ottoman R.J., Hane D.C., Brown C.R., Yilma S., James S.R., Mosley A.r., Crosslin J.M., Vales M.I.: Validation and implementation of marker-assisted selection (MAS) for PVY resistance ($R_{y_{adg}}$ gene) in a tetraploid potato breeding program. 2009, *Am. J. Pot. Res.*, 86:304-314.
229. Ounouna H, Kerlan C., Lafaye P., Loukili M.J., ElGaaied A.: Production of monoclonal antibodies against synthetic peptides of the N-terminal region of potato virus Y coat protein and their use in PVY strain differentiation. 2002, *Plant Pathol.*, 51:487-494.
230. Perez P., Collar J.L., Avilla C., Duque M., Fereres A.: Estimation of vector propensity of potato virus Y in open-field pepper crops of central Spain. 1995, *J. Econ. Entomol.*, 89:986-991.
231. Piche L.M., Singh R.P., Nie X., Gudmestad N.C.: Diversity among Potato virus Y isolates obtained from potatoes grown in United States. *Phytopathology*, 2004, 94:1368-1375.
232. Pirone T.P., Blanc S.: Help[er-dependent vector transmission of plant viruses. 1996, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 34:227-247.
233. Pirone T.P., Perry K.L.: Aphids: non-persistent transmission. 2002, *Adv. Bot. Res.*, 36:1-16.
234. Pompe-Novak M., Wrischer M., Ravnkar M.: Ultrastructue of chloroplasts in leaves of potato plants infected by potato virus Y^{NTN} . 2001, *Phyton-ann. Rei. Bot. A*, 41:215-226.
235. Powell A. P., Nelson R.S. Barun de Hoffmann N., Rogers S.G., Fraley R.T., Beachy R.N.: Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. 1986, *Science*, 232:738-743.

236. Pruss G., Ge X., Shi X.M., Carrington J.C., Bowman-Vance V.: Plant viral synergism: The potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. 1997, *Plant Cell*, 9:859-868.
237. Ramirez B.C., Barbier P., Seron K., Haenni A.L., Bernardi F.: Molecular mechanisms of point mutations in RNA viruses. W: *Molecular basis evolution*. 1993, Cambridge University Press, Cambridge, 105-118.
238. Ravlings N.D., Barrett A.J.: Families of cysteine peptidases. 1994, *Meth. Enzymol.*, 244:461-486.
239. Ravlings N.D., Barrett A.J.: Families and clans of cysteine peptidases. 1996, *Perspect. Drug Discov. Des.*, 6:1-11.
240. Restrepo-Hartwig M.A., Carrington J.C.: The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. 1994, *J. Virol.*, 68:2388-2397.
241. Revers F., Le Gall O., Candresse T., Le Romancer M., Dunez J.: Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. 1996, *J. Gen. Virol.*, 77:1953-1965.
242. Riechmann J.L., Lain S., Garcia J.A.: Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. 1992, *J. Gen. Virol.* 73:1-16.
243. Rigotti S., Gugerli P.: Rapid identification of potato virus Y strains by one-step triplex RT-PCR. 2007, *J. Virol. Methods*, 140:90-94.
244. Robaglia C., Durand-Tardif M., Tronchet M., Boudazin G., Astier-Manificier S., Casse-Delbart F.: Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA. *J. Gen. Virol.*, 1989, 70:935-947.
245. Robaglia C., Caranta C.: Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. 2006, *Trends Plant Sci.*, 11:40-45.
246. Rocznik statystyczny Rolnictwa 2007, GUS
247. Rocznik statystyczny Rolnictwa 2008, GUS
248. Rocznik statystyczny Rolnictwa 2009, GUS
249. Rodríguez-Cerezo E., Shaw J.G.: Two newly detected non-structural proteins in potyvirus-infected cells. 1991, *Virology*, 185:572-579.
250. Rojas M.R., Zerbini F.M., Allison R.F., Gilbertson R.L., Lucas W.J.: Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. 1997, *Virology*, 237:283-295.

251. Rolland M., Glais L., Kerlan C., Jacquot E.: A multiple single nucleotide polymorphisms interrogation assay for reliable Potatovirus Y group and variant characterization. *J. Virol. Methods*, 2008, 147:108-117.
252. Rolland M., Kerlan C., Jacquot E.: The acquisition of molecular determinants involved in potato virus Y necrosis capacity leads to fitness reduction in tobacco plants. 2009, *J. Gen. Virol.*, 90:244-252.
253. Romero A., Blanco-Urgoiti B., Soto M.J., Fereres A., Ponz F.: Characterization of typical pepper-isolates of PVY reveals multiple pathotypes within a single genetic strain. 2001, *Virus Res.*, 79:71-80.
254. Rosner A., Maslenin L.: Differentiating PVY^{NTN} from PVY^N by annealing to reference RNA transcripts. 2001, *J. Virol. Methods*, 97:125-131.
255. Rosner A., Maslenin L.: Tagging of viral RNA transcripts with strain-specific oligonucleotides: characterization and application. 2003, *J. Virol. Methods*, 110:105-109.
256. Roudet-Tavert G., Gherman-Retana S., Delaunay T., Delecolle B., Candresse T., Le Gall O.: Interaction between potyvirus helper component-proteinase and capsid protein in infected plants. 2002, *J. Gen. Virol.*, 83:1765-1770.
257. Rouis S., Traincard F., Gargouri R., Dartevelle S., Jeannequin O., Mazié J.C., Ayadi H. : Inhibition of potato virus Y N1a activity ; preparation of monoclonal antibody directed against PVY NI protein that inhibits cleavage of PVY polyprotein. 2001, *Arch. Virol.*, 146:1297-1306.
258. Rozendall A., Brust T.H.: The significance of potato virus S in seed potato culture. 1955, *Proc. 2nd Conf. Potato Virus Disease*, Lisse-Wageningen, 120-133.
259. Ruffel S., Dussault M.H., Palloix A., Moury B., Bendahmane A., Robaglia C., Caranta C.: A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). 2002, *The Plant J.*, 32:1067-1075.
260. Ruffel S., Gallois J.L., Lesage M.L., Caranta C.: The recessive potyvirus resistance gene *pot-1* is the tomato orthologue of the pepper *pvr2-eIF4E* gene. 2005, *Mol. Genet. Genom.*, 274:346-353.
261. Ruffel S., Gallois J.L., Moury B., Robaglia C., Palloix A., Caranta C.: Simultaneous mutations in translations initiations factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent Pepper vein mottle virus infection of pepper. 2006, *J. Gen. Virol.*, 87:2089-2098.

262. Saenz P., Salvador B, Simon-Mateo C., Kasschau K.D., Carrington J.C., Garcia J.A.: Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of potyviruses. 2002, *J. Virol.*, 76:1922-1931.
263. Salazar L.F., Bartolini I, Flores V.: Evidence for the existence of PVYNTN in the Andes and a hypothesis towards its origin. 2000, *Fitopatologia*, 35:87-90.
264. Sanz A., Cambra M., Perez de San Roman C., Miguet J.G., Cortés E., Gorris M.T., Vela C.: Preparation of additional monoclonal antibodies for detection and discrimination of potato virus Y isolates infecting potato. *Potato Res.*, 33:365-375.
265. Schaad M.C., Haldeman-Cahill R., Cronin S., Carrington J.C.: Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. 1996, *J. Virol.*, 70:7039-7048.
266. Schaad M.C., Jensen P.E., Carrington J.C.: Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. 1997, *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.*, 16:4049-4059.
267. Schubert J., Fomitcheva V., Sztangret-Wisniewska J.: Differentiation of Potato virus Y strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. *J. Virol. Methods*, 2007, 140:66-74.
268. Serra M.C., Weidemann H.L.: First report of potato tuber-necrotic ringspot disease caused by PVY^{NTN} in Portugal. 1997, *Plant Dis.*, 81:694.
269. Shahabuddin M., Shaw J.G., Rhoads R.E.: Mapping of the tobacco vein mottling virus VPg cistron. 1988, *Virology*, 173:499-508.
270. Shand K., Theodoropoulos C., Stenzel D., Dale J.L., Harrison M.D.: Expression of potato virus Y cytoplasmic inclusion protein in tobacco results in disorganization of parenchyma cells, distortion of epidermal cells and induces mitochondrial and chloroplast abnormalities, formation of membrane whorls and atypical lipid accumulation. 2009, *J. Micron*, 40:730-736.
271. Sholthof H.B.: Plant virus transport: motions of functional equivalence. 2005, *Trends in Plant Sci.*, 10(8):376-382.
272. Shukla D.D., Strike P.M., Tracy S.L., Gough K.H., Ward C.W.: The N and C termini of coat proteins of potyviruses are surface-located and the N-terminus contains the major virus-specific epitopes. 1988, *J. Gen. Virol.*, 69:1497-1508.

273. Shukla D.D., Frenkel M.J., Ward C.W.: Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. 1991, *Can. J. Plant Pathol.*, 13:178-191.
274. Shukla D.D., Ward C.W., Brunt A.A.: *The Potyviridae*. CAB International. Wallingford, Oxfordshire, UK, 1994.
275. Siaw M.F.E., Shahabuddin M., Ballard S., Shaw J.G., Rhoads R.E.: Identification of a protein covalently linked to the 5' terminus of tobacco vein mottling virus RNA. 1985, *Virology*, 142:134-143.
276. Sievert R.C.: Sources of resistance to potato virus Y in the genus *Nicotiana*. 1972, *Tobacco Science*, 16:92-94.
277. Sigvald R.: The relative efficiency of some aphid species as vector of potato virus Y^O (PVY^O). *Potato Res.*, 1984, 27:285-290.
278. Singh M.N., Khurana S.M.P., Nagaich B.B.: Evidence on heredity variations in the virus transmission efficiency of aphid clones. 1984, *Z. Pflanzenkrankh.*, 90:345-351.
279. Singh R.P.: Incidence of the tobacco veinal necrotic strain of potato virus Y (PVYN) in Canada in 1990 and 1991 and scientific basis for eradication of the disease. 1992, *Can Plant Dis.*, 81:694.
280. Singh R.P.: Incidence of the potato virus (PVYN) in Canada in 1990 and 1991 and scientific basis for eradication of the disease. 1992, *Can. Plant Dis. Surv.*, 72:113-119.
281. Singh R.P., Boucher A., Somerville T.H., Dhar A.K. : Selection of monoclonal antibody to detect PVYN and its use in ELISA and DIBA assays. 1993, *Can. J. Plant Pathol.*, 15:293-300.
282. Singh R.P., Singh M., McDonald J.G.: Screening by a 3-primer PCR of North American PVY^N isolates for European-type members of the tuber necrosis-inducing PVY^{NTN} subgroup. 1998, *Can. J. Plant Pathol.*, 20:227-233.
283. Singh R.P., Nie X., Singh M.: Duplex RT-PCR: reagent concentrations at reverse transcription stage affect the PCR performance. 2000, *J. Virol. Methods*, 86:121-129.
284. Singh R.P., McLaren D.L., Nie X., Singh M.: Possible escape of a recombinant isolate of potato virus Y by serological indexing and methods of its detection. 2003, *Plant Dis.*, 87:679-685.

285. Singh R.P., Valkonen J.P.T., Gray S.M., Boonham N., Jones R.A.C., Kerlan C., Schubert J.: Discussion Paper: The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. Arch. Virol., 2008, 153:1-13.
286. Smith K.M.: Composite nature of certain potato viruses of the mosaic group. 1931, Nature, 127:702.
287. Smith K.M., Dennis R.W.G.: Some notes on a suspected variant of *Solanum virus 2* (potato virus Y), 1940, Ann. Appl. Biol., 27:65-70.
288. Soto M.J., Luis Artega M., Fereres A., Ponz F.: Limited degree of serological variability in pepper strains of potato virus Y as revealed by analysis with monoclonal antibodies. 1994, Ann, Appl. Biol., 124:37-43.
289. Soumounou Y., Laliberte J.F.: Nucleic acid-binding properties of the P1 protein of turnip mosaic potyvirus produced in *Escherichia coli*. J. Gen. Virol. 75:2567-2573.
290. Stobbs L.W., Pysa V., VanSchagen J.G.: Susceptibility of cultivars of tomato and pepper to a necrotic strain of potato virus Y. 1994, Can. J. Plant Pathol. 16:43-48.
291. Spetz C., Valkonen J.P.T.: Potyviral 6K2 protein long-distance movement and symptom-induction functions are independent and host-specific. 2005, MPMI, 17(5):505-510.
292. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S.: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA). Software version 4.0, 2007, Mol. Biol. Evol. 24(8):1596-1599.
293. Thole V., Dalmay T., Burgyan J., Balazs E.: Cloning and sequencing of potato virus Y (Hungarian isolate) genomic RNA. 1993, Gene, 123:149-156.
294. Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G.: The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. 1997, Nucleic Acids Research, 24:4876-4882.
295. Tomassoli L., Lumia V., Cerato C., Ghedini R.: Occurrence of potato tuber necrotic ringspot disease (PT-NRD) in Italy. 1998, Plant Dis., 82:350.
296. Tomimura K., Špak J., Katis N., Jenner C.E., Walsh J.A., Gibbs A., Ohshima K.: Comparisons of the genetic structure of populations of turnip mosaic virus in west and east Eurasia. 2004, Virology, 330:408-423.
297. Tordo J.M.V., Chachulska A.M., Fakhfakh H., Le Romancer M., Robaglia C., Astier-Manifacier S.: Sequence polymorphism in the 5'NTR and in the P1 coding region of potato virus Y genomic RNA. 1995, J. Gen. Virol., 76:939-949.

298. Tribodet M., Glais L., Kerlan C., Jacquot E.: Characterization of *Potato virus Y* (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVY^N isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *J. General Virol.*, 2005, 86:2101-2105.
299. Valkonen J.P.T.: Viruses: economical losses and biotechnological potential. 2007, *Potato Biology and biotechnology: advances and perspectives*. Elsevier Oxford, str:619-641.
300. Valleau W.D., Johnson E.M.: The relation of some tobacco viruses to potato degeneration. 1930, *Kentucky Agr. Exp. Sta. Bul.*, 309:475-507.
301. Van der Vlugt R.A.A., Leunissen J., Goldbach R.: Evidence for sense RNA-mediated protection to PVY^N in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. 1992, *Plant. Mol. Biol.*, 20:631-639.
302. Van der Vlugt R.A.A., Leunissen J., Goldbach R.: Taxonomic relationships between distinct potato virus Y isolates based on detailed comparisons of the viral coat proteins and 3'-nontranslated regions. 1993, *Arch. Virol.*, 131:361-375.
303. Van Hoof H.A.: Aphid vectors of potato virus Y^N. 1980, *Neth J. Plant Pathol.*, 86:159-162.
304. Verchot J.M., Koonin E.V., Carrington J.C.: The 35-kDa protein from the N-terminus of a potyviral polyprotein functions as a third virus encoded proteinase. 1991, *Virology*, 185:527-535.
305. Verchot J., Herndon K.L., Carrington J.C.: Mutational analysis of the tobacco etch potyviral 35 kDa proteinase: identification of essential residues and requirements for autoproteolysis. *Virology*, 190:298-306.
306. Verchot J., Carrington J.C.: Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by second-site modifications. 1995, *J. of Virology*, 69(3):1582-1590.
307. Verrier J.L., Marchand V., Cailleateau 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.
308. Verrier J.L.: PVY Collaborative Experiment. Results 2001. Altadis, Institut du Tabac, Bergerac, France, 2001a.
309. Verrier J.L. : PVY Collaborative experiment. 2001b, Potocol. Bergerac, France.
310. Vivanco J.M., Querci M., Salazar L.F. : Antiviral nad antiviroid activity of MAP-containing extracts from *Mirabilis jalapa* roots. 1999, *Plant Dis.* 83:1116-1121.

311. Wang R.Y., Ammar E.D., Thornbury D.W., Lopez-Moya J.J., Pirone T.P.: Loss of potyvirus transmissibility and helper-component activity correlate with non-retention of virions in aphid stylets. 1996, *J. Gen. Virol.*, 77:861-867.
312. Ward C.W., Weiller G.F., Shukla D.D., Gibbs A.: Molecular systematics of the Potyviridae, the largest plant virus family. (In:) Gibbs A. J., Calisher C.H., Garcia-Arenal F. *Molecular basis of evolution*. Cambridge University Press, 1994, 477-500.
313. Watts N., Singh R.P.: Discrimination between common and necrotic strains of potato virus Y by denaturing isoelectric focusing. 1994, *Phytopathology*, 84:991-994.
314. Weidemann H.L., Maiss E.: Detection of the potato tuber necrotic ringspot strain of potato virus Y (PVY^{NTN}) by reverse transcription and immunocapture polymerase chain reaction. 1996, *J. Plant Dis. Protect.*, 103:337-345.
315. Weilguny H., Singh R.P.: Separation of Slovenian isolates of PVY^{NTN} from the North American isolates PVY^N by a 3-primer PCR. 1998, *J. Virol. Methods*, 71:57-68.
316. Wen C., Wu Y., Li H., Wang H., Liu Q.: Influences on photosynthesis and respiration of tobacco infected by potato virus Y – vein necrosis strain. *Bull. Inf. CORESTA*, Suzhou, China, 1999, 10-11.
317. Wernsman E.A.: Sources of resistance to virus diseases. 1992, *CORESTA Inf. Bull.* 3(4):113-119.
318. Whitworth J.L., Novy R.G., Hall D.G., Crosslin J.M., Brown C.R.: Characterization of broad spectrum potato virus Y resistance in *Solanum tuberosum* ssp. *Andigena*-derived population and select breeding clones using molecular markers, grafting, and field inoculations. 2009, *Am. J. Pot. Res.*, 86:286-296.
319. Witherspoon W.D. Jr, Wernsman E.A., Gooding G.V. Jr, Rufty R.C.: Characterization of a gametoclonal variant controlling virus resistance in tobacco. 1991, *Theor. Appl. Genet.*, 81:1-5.
320. Wittmann S., Chatel H., Fortin M.G., Laliberté J.F.: Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. 1997, *Virology*, 234:84-92.
321. Xu H., Nie J., De Boer S.H.: Differentiation and molecular detection of Canadian necrotic strains of potato virus Y. 2005, *Can. J. Plant Pathol.*, 27:125-131.

322. Xu H.: Occurrence of potato tuber necrotic isolates of potato virus Y in a commercial tobacco field in southern Ontario, Canada. 2008, *Plant Disease*, 92(11):1586.
323. Yeam I., Cavatorta J.R., Ripoll D.R., Kang B.C., Jahn M.M.: Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive potyvirus resistance in plants. 2007, *Plant Cell*, 19:2913-2928.
324. Yi H.Y., Rufty R.C., Wernsman E.A., Conkling M.C.: Mapping the root-knot nematode resistance gene (*Rk*) in tobacco with RAPD markers. 1998, *Plant Dis.*, 82:1319-1322.
325. Yoshi M., Nishikiori M., Tomita K., Yoshioka N., Kozuka R., Naito S., Ishikawa M.: The *Arabidopsis* cucumovirus multiplication 1 and 2 loci encode translation initiation factors 4E and 4G. 2004, *J. Virol.*, 78:6102-6111.

Izolaty	Testy biologiczne						Testy serologiczne	
	VAM		Wiślica		Samsun H		ELISA	ELISA
	I	II	I	II	I	II	1	2
11.K326/A/07	ns	ns	ns	ns	ns	vn	+	-
12.NC95/A/07	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+	-
22.By21/A/07	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
23.By21/A/07	ns	ns	ns	ns	vc	vn	+	-
24.Ky17/A/07	ns	ns	ns	ns	vc	vn	+	-
1.K326/G/07	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+	-
2.K326/G/07	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+	+
3.Ky17/G/07	ns	ns	ns	ns	vc	vn	+	-
4.Ky17/G/07	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	+
5.NC95/G/07	ns	ns	ns	ns	vc	vn	+	-
6.By21/G/07	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	+
7.By21/G/07	ns	ns	ns	ns	vc	vn	+	-
8.Hb92/G/07	ns	ns	ns	ns	vc	vn	+	-
9.By21/G/07	ns	ns	ns	ns	vc	vn	+	-
10.Ky17/G/07	ns	ns	ns	ns	vc	vn	+	-
11.K326/G/07	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
12.Ky17/G/07	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	+
13.NC95/G/07	ns	ns	ns	ns	vc	vn	+	+
21.K326/G/07	ns	ns	ns	ns	vc	vn	+	-
23.TN86/G/07	vn	vn	vn	vn	vn	vn	+	+
24.K326/G/07	ns	ns	ns	ns	vc	vn	+	-
1.Ky17/J/07	ns	ns	ns	ns	ns	vn	+	-
2.Hb92/J/07	ns	ns	ns	ns	vc	vn	+	-
3.By21/J/07	ns	ns	ns	ns	vc	vn	+	-
4.Hb92/J/07	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
5.K326/J/07	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+	+
6.NC95/J/07	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
7.Ky17/J/07	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
8.By21/J/07	ns	ns	ns	ns	vc	vn	+	-
9.Hb92/J/07	ns	ns	ns	ns	vc	vn	+	-
1.By21/P/07	ns	ns	ns	ns	vc	vn	+	-
2.NC95/P/07	ns	ns	ns	ns	vc	vn	+	-
3.K326/P/07	ns	ns	ns	ns	vc	vn	+	+
4.Ky17/P/07	ns	ns	ns	ns	vc	vn	+	-
5.Hb92/P/07	ns	ns	ns	ns	ns	vn	+	-
6.K326/P/07	ns	ns	ns	ns	ns	vn	+	-
7.NC95/P/07	ns	ns	ns	ns	vc	vn	+	-
8.Hb92/P/07	ns	ns	ns	ns	ns	vn	+	-
10.Ky17/P/07	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
1.Hb92/A/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
2.Hb92/A/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
3.By21/A/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
4.By21/A/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
5.NC95/A/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
6.VSCR/A/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
7.K326/A/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
8.Ky17/A/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
9.Ky17/A/08	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	-
10.Hb92/A/08	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	-
11.Hb92/A/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
12.by21/A/08	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	-
13.K326/A/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
14.NC95/A/08	ns	ns	ns	ns	vc	vc	+	-
15.Ky17/A/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
16.Ky17/A/08	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	-
17.K326/A/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
18.By21/A/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-

Izolaty	Testy biologiczne						Testy serologiczne	
	VAM		Wiślica		Samsun H		ELISA	ELISA
	I	II	I	II	I	II	1	2
21.Ky17/J/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
22.K326/J/08	nd	ns	nd	nd	nd	nd	+	+
23.NC95/J/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	+
24.Hb92/J/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
25.Wiślica/J/08	vn	vn	vn	vn	vn	vn	+	+
26.VSCR/J/08	vn	vn	vn	vn	ns	ns	+	+
27.Wiślica/J/08	vn	vn	vn	vn	vn	vn	+	+
1.By21/P/08	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	-
2.NC95/P/08	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	-
3.K326/P/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	+
4.Ky17/P/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
5.Hb92/P/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
6.BPA/P/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
7.BPAzg/P/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
8.By21/P/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
9.K326/P/08	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+	+
10.NC95/P/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	+
11.Hb92/P/08	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+	-
12.Ky17/P/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	+
13.BPAcms/P/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
14.BPAcms/P/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	+
15.BPAcms/P/08	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+	+
16.BPAcms/P/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	+
17.BPAcms/P/08	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	-
18.BPAcms/P/08	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	-
19.BPAcms/P/08	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	-
20.BPAcms/P/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	-
2. By21/Cro/07	ns	vc	ns	vc	vn	vn	+	+
3. K326/Cro/07	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	+
1/Cro/o8	vn	vn	vn	vn	vn	vn	+	+
2/Cro/08	vn	vn	vn	vn	vn	vn	+	+
4/Cro/08	vn	vn	vn	vn	vn	vn	+	+
7/Cro/08	ns	vc	ns	vc	vn	vn	+	+
9/Cro/08	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	+
1. VAM/N/07	vc	vn	ns	vn	vn	vn	+	+
2. TN86/N/07	vc	vn	vc	vn	vn	vn	+	+
7. K326/N/07	ns	vc	ns	ns	ns	vn	+	+
9. NC95/N/07	ns	ns	ns	ns	vn	vn	+	+
10. VSCR/N/07	ns	vn	ns	vn	vn	vn	+	-
12. HYB21/N/07	ns	vn	ns	vn	vn	vn	+	-
28. PBD6/N/07	ns	vn	ns	vn	vn	vn	+	-
36. HYV17/N/07	vc	vn	vc	vn	vn	vn	+	+
4. HYV23/N/08	vn	vn	vn	vn	vn	vn	+	+
5. By21/N/08	cs	cs	cs	vc	vn	vn	+	+
6. VSCR/N/08	vn	vn	vn	vn	vn	vn	+	+
7. HYV10/N/08	cs	cs	ns	ns	vn	vn	+	-
9. VSCR/N/08	ns	vn	cs	vc	vn	vn	+	-

ns – brak objawów, cs – chlorotyczne plamy, vc – przejaśnienia nerwów, vn – nekrozy nerwów, nd – brak danych (doświadczenia w trakcie), ELISA 1 – MoAbs anti Y, ELISA 2 - MoAbs antiY^N, + wynik pozytywny, - wynik negatywny, I – pierwszy termin obserwacji – 14 dni po inokulacji, II – drugi termin obserwacji – 21 dni po inokulacji, A – Augustów, G – Grudziądz, P – Puławy, J – Jędrzejów, Cro – Chorwacja, N – Niemcy.