

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
- Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie

Anna Grupa-Urbańska

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**Interakcje między izolatami wirusa Y ziemniaka (*Potato virus Y*, PVY) i
wirusa M ziemniaka (*Potato virus M*, PVM) w infekcjach mieszanych**
(zbiór publikacji)

Promotor:

Dr hab. Jerzy Syller prof. nadzw. IHAR-PIB

Recenzenci:

Dr hab. Beata Hasiów-Jaroszewska

Instytut Ochrony Roślin-PIB
Zakład Wirusologii i Bakteriologii
ul. Wł. Węgorka 20
60-318 Poznań

Prof. dr hab. Jacek Hennig

Instytut Biochemii i Biofizyki
Polskiej Akademii Nauk
Pawińskiego 5a
02-106 Warszawa

Radzików, 2019

WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- I. **Grupa A.**, Syller J. (2015). Mieszane infekcje wirusowe roślin: współdziałanie czy rywalizacja terytorialna między wirusami? *Kosmos* 64 (1): 47–56
- II. Syller J., **Grupa A.** (2016). Antagonistic within-host interactions between plant viruses: molecular basis and impact on viral and host fitness. *Molecular Plant Pathology* 17 (5): 769-782
 - a. Doi: 10.1111/mpp.12322
 - b. IF_{2015*} 4.335
- III. Syller J., **Grupa A.** (2014). The effects of co-infection by different *Potato virus Y* (PVY) isolates on virus concentration in solanaceous hosts and efficiency of transmission. *Plant Pathology* 63 (2): 466-475
 - a. Doi: 10.1111/ppa.12095
 - b. IF_{2013*} 2.969
- IV. **Grupa A.**, Otulak-Kozieł K., Syller J. (2018). Serological, molecular and immunofluorescent evidence for interference competition between isolates of *Potato virus Y*. *Plant Pathology* 67 (9): 1997-2012
 - a. Doi: 10.1111/ppa.12892
 - b. IF_{2018*} 2.303
- V. **Grupa A.**, Syller J. (2016). Cross-protection between a naturally occurring mild isolate of *Potato virus M* (PVM) and a more virulent isolate in *Datura metel* plants. *Journal of Phytopathology* 164 (1): 69-73
 - a. Doi: 10.1111/jph.12386
 - b. IF_{2015*} 0.945

IF *- Impact Factor w roku ukazania się publikacji online

WPROWADZENIE

Pojedyncza roślina uprawna bądź dziko rosnąca może być gospodarzem więcej niż jednego wirusa lub szczepu wirusowego i może w związku z tym ulec infekcji mieszanej. Mieszana infekcja powstaje w wyniku jednoczesnego lub zróżnicowanego w czasie zakażenia rośliny-gospodarza co najmniej dwoma wirusami, bądź co najmniej dwoma szczepami lub izolatami tego samego wirusa. Zakażenie jednoczesne jest zazwyczaj określane w literaturze mianem koinfekcji, natomiast próba wtargnięcia do rośliny już zakażonej wirusem innego szczepu/izolatu tego wirusa bądź wirusa innego gatunku często nazywane jest superinfekcją.

Wzajemne oddziaływanie wirusów niespokrewnionych ze sobą ma zwykle charakter synergistyczny lub obojętny. Natomiast w przypadku wirusów blisko ze sobą spokrewnionych, w szczególności szczepów/izolatów tego samego gatunku, dominują oddziaływania o charakterze antagonistycznym (Syller, 2012; Zhang i in., 2019).

Interakcje synergistyczne między wirusami mają z reguły destrukcyjny wpływ na roślinę-gospodarza, zwykle bowiem powodują poważne zaostrenie objawów chorobowych, w porównaniu z objawami na roślinach porażonych tymi wirusami oddzielnie (Li i in., 2014; Zhang i in., 2019). Dzieje się tak dlatego, że jeden z wirusów zasiedlających tkanki wspólnego gospodarza pozytywnie stymuluje namnażanie i akumulację drugiego wirusa. Niekiedy oba wirusy ułatwiają sobie wzajemnie przebieg tak istotnych procesów w cyklu życiowym wirusa, jak replikacja, tropizm komórkowy czy transmisja wirusa (Mascia i Gallitelli, 2016).

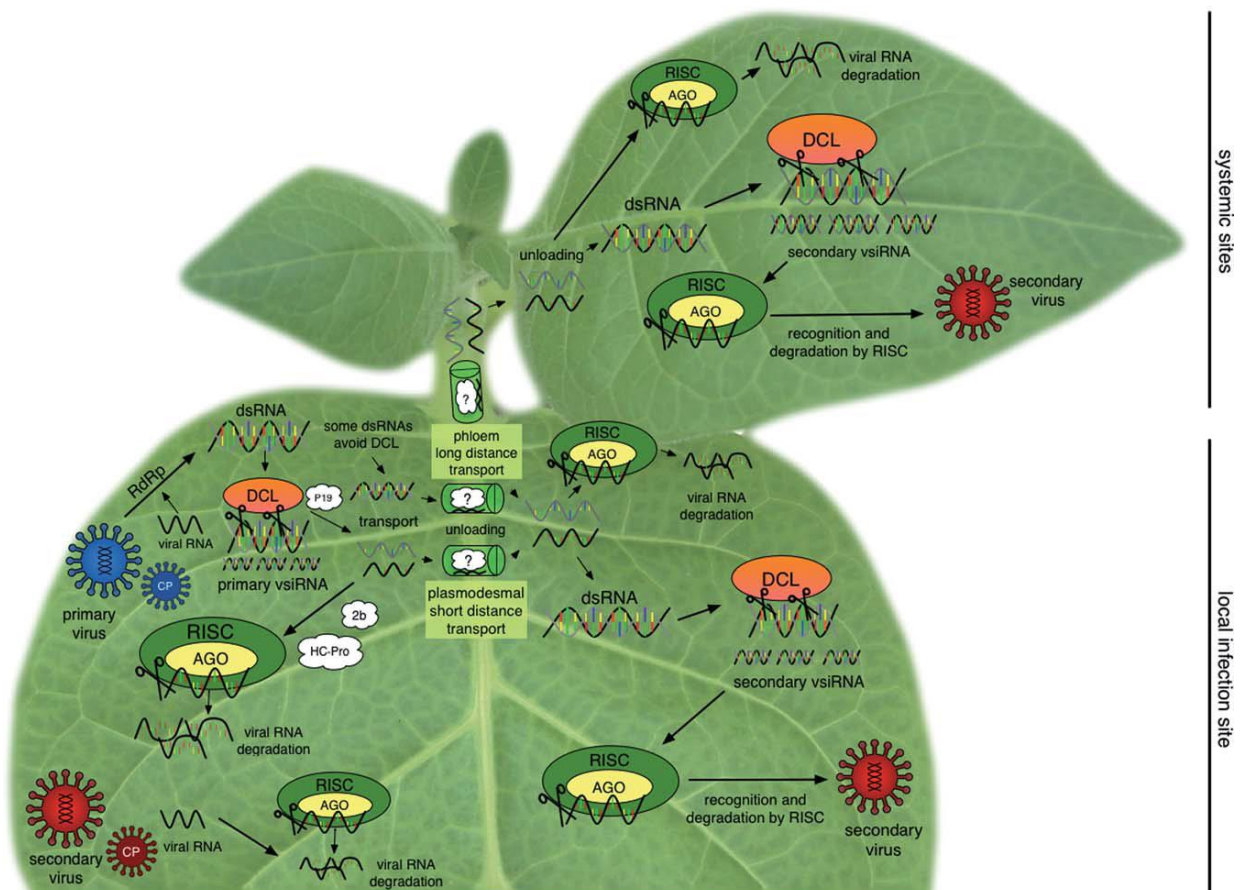
Znaną formą interakcji antagonistycznej między wirusami jest odporność krzyżowa, określana również, zwłaszcza w praktyce rolniczej, jako ochrona krzyżowa (ang. *cross-protection*) (Ziebell i Carr, 2010), bądź, coraz częściej, terminem *superinfection exclusion* (SIE), którego odpowiednikiem w polskiej literaturze wirusologicznej mogłoby być określenie ‘wykluczenie nadkażenia’ (Grupa i Syller, 2015).

Zjawisko po raz pierwszy opisał McKinney (1929), który odkrył, że porażenie roślin tytoniu tzw. „zielonym szczepem” wirusa mozaiki tytoniu (*Tobacco mosaic virus*, TMV) chroni je przed infekcją przez „żółty szczep” TMV. W późniejszych latach, zjawisko opisano dla wielu wirusów ludzkich i zwierzęcych, w tym wirusów: odry (Ludlow i in., 2005), zapalenia wątroby typu C (Tscherne i in., 2007), grypy typu A (Huang i in., 2008), różyczki (Claus i in., 2007), jak również dla dwuniciowych wirusów DNA, w tym wirusa opryszczki

czy pokswirusów, np. wirusa ospy prawdziwej (Kobiler i in., 2010; Laliberte i Moss, 2014; Zhang i in., 2017). Najczęściej jednak zjawisko wykluczenia nadkażenia było badane w odniesieniu do wirusów roślinnych.

Pomimo dużego znaczenia tego zjawiska w patogenezie wirusowej, a także dostępności nowoczesnych i różnorodnych technik badawczych, wiedza o tym, dlaczego i w jaki sposób jeden wirus wyklucza inny, jest wciąż niezadowalająca. Molekularne mechanizmy tego zjawiska nie zostały jeszcze poznane.

Obecnie uważa się, że w większości przypadków podstawą mechanizmu wykluczenia nadkażenia jest indukcja mechanizmu wyciszania RNA wirusowego poprzez zjawisko RNAi (ang. *RNA interference*) (Ziebell i Carr, 2010; Folimonova i in., 2014; Grupa i Syller, 2015; Syller i Grupa, 2016; Turco i in., 2018). Uproszczony model mechanizmu przedstawiono w publikacji przeglądowej **II**.



Rys. 1. Model mechanizmu wykluczenia nadkażenia (Syller i Grupa, 2016).

Podczas pierwotnej infekcji komórki gospodarza (wirus w kolorze niebieskim), z jednoniciowego wirusowego RNA (ang. *single-stranded RNA*, ssRNA) powstają za pośrednictwem polimerazy RNA zależnej od RNA (ang. *RNA-dependent RNA polymerase*, RdRP) dwuniciowe cząsteczki RNA (ang. *double-stranded RNA*, dsRNA). Rozpoznanie dsRNA przez specyficzne receptory komórki roślinnej prowadzi do indukcji mechanizmu wyciszenia RNA wirusowego. W pierwszym etapie dsRNA zostaje enzymatycznie pocięte na krótkie, 21-23 nukleotydowe dwuniciowe odcinki RNA (ang. *virus small interfering RNA*, vsiRNA). Transport vsiRNA do sąsiednich komórek odbywa się poprzez plazmodesmy i floem (Niehl i Heinlein, 2010; Hull, 2014). Enzymem, który tnie dsRNA, jest RNAza III, określana jako Dicer-like (DCL). Uzyskany vsiRNA związany z białkiem AGO wprowadzany jest do wielobiałkowego, indukowanego przez RNA kompleksu wyciszającego (ang. *RNA-induced silencing complex*, RISC). Cząsteczki sRNA są sortowane przez kompleksy białkowe AGO na podstawie identyczności 5' nukleotydowej sekwencji genomowej (Fang i Qi, 2016; Turco i in., 2018). Aktywny RISC z jednoniciowym vsiRNA służy jako sonda umożliwiająca specyficzne rozpoznanie i degradację komplementarnych cząsteczek RNA drugiego wirusa (kolor czerwony) (Pallas i García, 2011; Ma i in., 2015; Syller i Grupa, 2016).

Mechanizm zjawiska wykluczenia nadkażenia jest wykorzystywany w praktyce rolniczej, gdzie celowe zakażenie roślin łagodnym szczepem wirusa chroni je przed infekcją szczepem o większej wirulencji (Gal-On i Shibolet, 2006; Ziebell i Carr, 2010; Nishiguchi i Kobayashi, 2011; Folimonova, 2013; Grupa i Syller, 2015; Syller i Grupa, 2016; Pechinger i in., 2019; Zhang i in., 2019).

Ochrona krzyżowa w celu ograniczenia występowania choroby powodowanej przez wirusa mozaiki pepino (*Pepino mosaic virus*, PepMV) jest stosowana na znaczną skalę w Holandii, Belgii i Maroku. Produkt handlowy w oparciu o łagodny szczep PepMV (PMV-01) jest wynikiem 10 lat badań prowadzonych w Belgii i innych krajach Europy. Co więcej, szczepionka PMV[®]-01 jest już oficjalnie zarejestrowana i dostępna w Polsce. W styczniu 2017 roku Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi formalnie zarejestrowało PMV[®]-01 jako środek ochrony roślin, zgodnie z przepisami unijnymi (EC) N° 1107/2009.

CEL BADAŃ

Celem badań było wieloaspektowe scharakteryzowanie interakcji między różnymi genetycznie izolatami wirusa Y ziemniaka (*Potato virus Y*, PVY) w infekcjach mieszanych w roślinach ziemniaka i tytoniu z wykorzystaniem metod biologicznych, serologicznych, molekularnych i immunofluorescencyjnych. Ponadto, oceniano zdolność mszycy brzoskwiowo-ziemniaczanej *Myzus persicae* Sulz. do jednoczesnego przenoszenia dwóch izolatów PVY. Kolejnym celem badań było poznanie interakcji między różnymi izolatami wirusa M ziemniaka (*Potato virus M*, PVM) w infekcjach mieszanych. W przypadku tego wirusa najodpowiedniejszą rośliną eksperymentalną, spośród wstępnie przetestowanych, okazał się bieleń surmikwiat (*Datura metel* L).

HIPOTEZY BADAWCZE:

- Wewnątrzgatunkowe interakcje między izolatami PVY i PVM w infekcjach mieszanych mają charakter antagonistyczny.
- Konsekwencją wewnątrzgatunkowej konkurencji między izolatami PVY i PVM w infekcjach mieszanych jest występowanie zjawiska wykluczenia nadkażenia.
- Efekt rywalizacji między izolatami PVY zależy od kondycji/zdolności przystosowawczej (ang. *fitness*) izolatu i od terminu powstania infekcji lub wykonania inokulacji każdym z pary izolatów.
- Przebieg antagonistycznych interakcji między różnymi izolatami PVY w infekcjach mieszanych zależy od gatunku rośliny gospodarza.
- Pojedyncze mszyce gatunku *M. persicae* są zdolne do równoczesnego nabywania i przenoszenia dwóch izolatów PVY z rośliny o mieszanej infekcji.

WYNIKI BADAŃ

Do badań interakcji między izolatami PVY wytypowano osiem różnych genetycznie izolatów PVY z kolekcji IHAR-PIB, Oddział Młochów (Tab. 1).

Tabela 1. Charakterystyka izolatów PVY użytych w badaniach

Nazwa	Nr w bazie NCBI	Objawy ^a		Wielkość produktów Multiplex RT-PCR [bp] ^b	Klasyfikacja PVY
		tytoń	ziemniak		
Li	KY112748	m/vc	m/mg/lw	267 & 689 bp	O
FrKV2	KY112747	vn/lm	m/mg	181 & 689 bp	N:O
Wy	KY112749	m/vc	m/mg/lw	181 & 689 bp	N-Wi *
Wi	EF558545	vn/lm	m/mg	181 & 689 bp	N-Wi
Cou8/03	JF804780	vn/lm	m/mg	181 & 452 bp	NTN
47/96	KY092173	vn/lm	m/mg	181 & 452 bp	NTN
Fr-Orl	-	vn/lm	m/mg	181 & 452 bp	NTN
NZ	JF804788	vn/lm	m/mg	181 & 452 bp	NTN

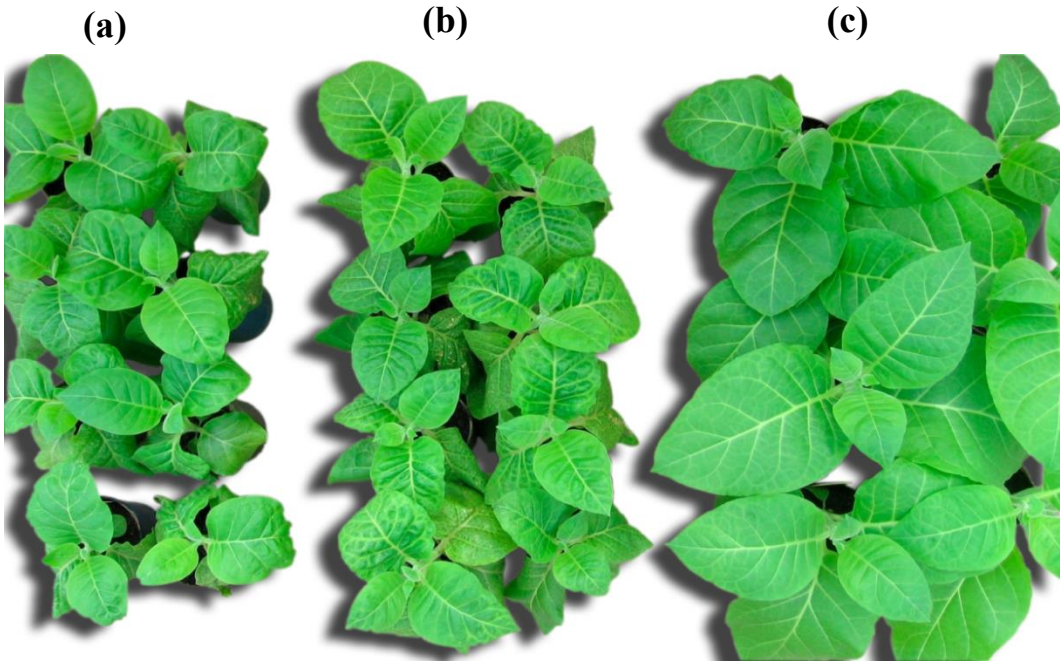
NCBI - National Center for Biotechnology Information, bp – para zasad (ang. base pair)
 am- mozaika (ang. mosaic), vc - przejaśnienia nerwów (ang. vein clearing), vn - martwica nerwów (ang. vein necrosis), lm – malformacja/zniekształcenie liści (ang. leaf malformation), mg - cętkowanie (ang. mottling), lw - więdnienie liści (ang. leaves wilting)

b Identyfikacja szczepów PVY za pomocą reakcji multiplex RT-PCR (Lorenzen i in., 2006)

* Izolat Wy był wcześniej uważany za przedstawiciela szczepu O.

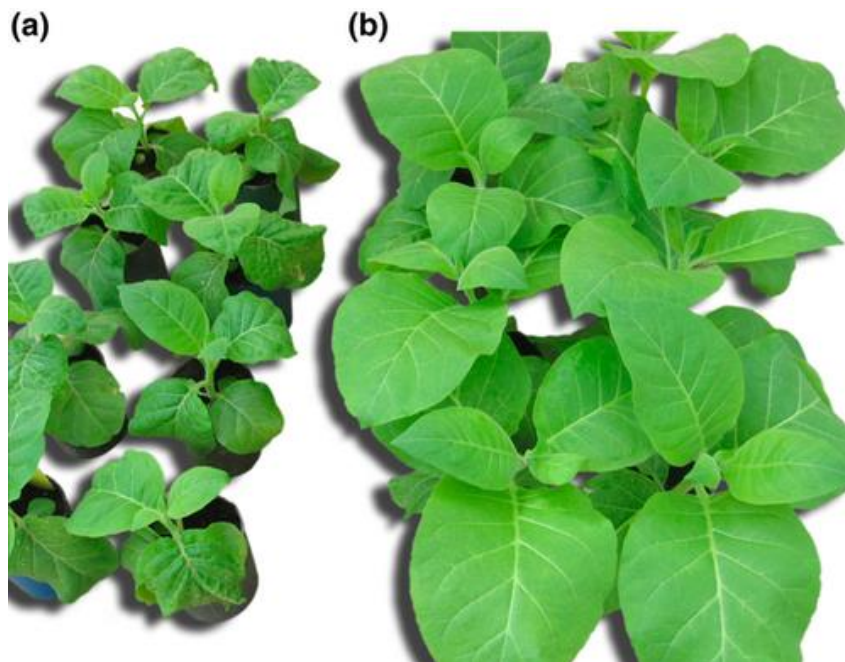
Roślinami testowymi byli przedstawiciele rodziny Solanaceae: ziemniak (*Solanum tuberosum* L.) odmiany Irga, Satina i Cyprian oraz tytoń (*Nicotiana tabacum* L.) odmiany Samsun. Rośliny inokulowano dobranymi w pary izolatami PVY równocześnie bądź w odstępie 3 lub 7 dni, w różnej kolejności, dla oceny występowania zjawiska wykluczenia nadkażenia.

Testy biologiczne wykazały, że objawy infekcji zależały od kombinacji izolatów PVY użytych do inokulacji roślin tytoniu. Na przykład, efektem jednoczesnej inokulacji roślin tytoniu izolatami PVY^{NTN}Cou8/03 i PVY^OLi było wystąpienie silnych objawów porażenia, przypominających objawy wywoływane przez bardziej wirulentny izolat PVY^{NTN}Cou8/03 w infekcji pojedynczej (Rys. 2).



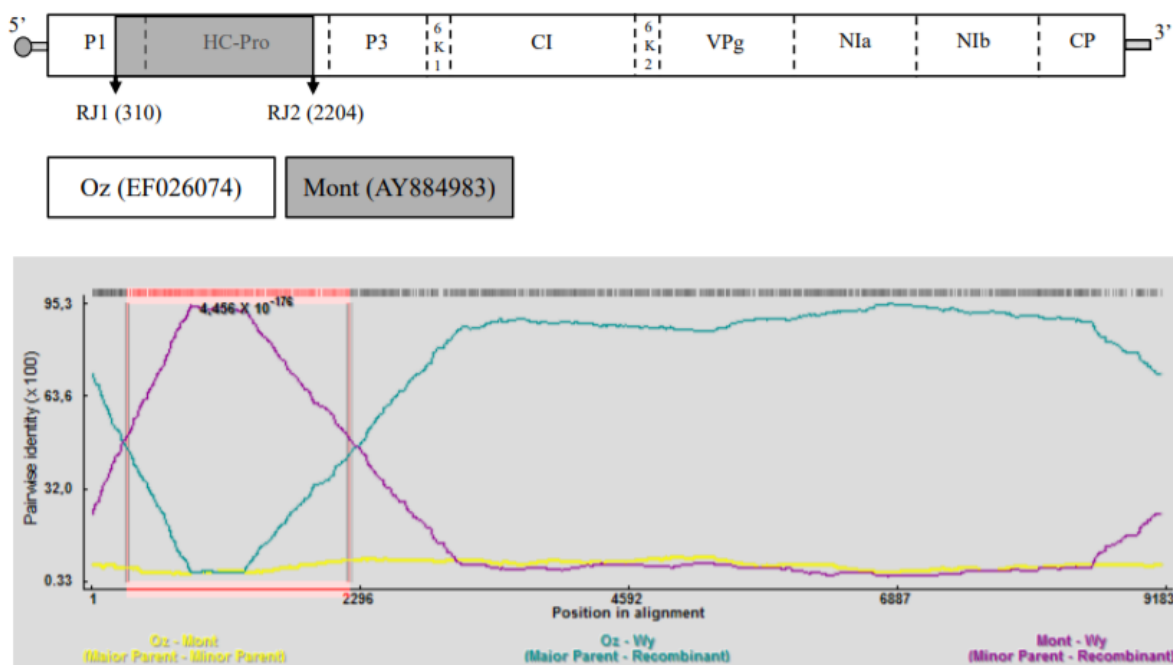
Rys. 2. Objawy infekcji PVY na roślinach tytoniu odm. Samsun inokulowanych izolatami ^{NTN}Cou8/03 i ^oLi pojedynczo (odpowiednio: a i c) i obydwoma izolatami jednocześnie (b).

Inaczej zareagowały rośliny tytoniu w przypadku koinfekcji izolatami PVY^{NTN}Cou8/03 i PVY^{N-Wi}Wy. Tutaj dominowały objawy porażenia podobne w nasileniu i charakterze do objawów obserwowanych na roślinach pojedynczo zakażonych łagodnym izolatem PVY^{N-Wi}Wy (Rys. 3). Natomiast w obrębie ziemiaka nie zaobserwowano różnic w charakterze i nasileniu objawów między roślinami pojedynczo i podwójnie zakażonymi PVY.



Rys. 3. Objawy infekcji PVY na roślinach tytoniu odm. Samsun inokulowanych pojedynczo izolatem ^{NTN}Cou8/03 (a) i w połączeniu z izolatem ^{N-Wi}Wy (b).

Izolaty Wy były do niedawna uważane za przedstawicieli szczepu O, jednak scharakteryzowanie całej genomowej sekwencji tego izolatu oraz analiza bioinformatyczna wykazały (**Publikacja IV**), że należy on do podgrupy N-Wi (Rys. 4).



Rys. 4. Struktura genomowa izolatu ^{N-Wi}Wy. Izolat zawiera dwa zdarzenia rekombinacyjne, jedno w regionie P1, drugie w regionie HC-Pro / P3.

Stwierdzono istotne obniżenie koncentracji określonych izolatów PVY w teście ELISA na skutek koinfekcji z innymi izolatami tego wirusa. W roślinach ziemniaka odm. Irga obecność któregoś z wirulentnych izolatów PVY^{NTN} powodowała istotne obniżenie koncentracji łagodnych izolatów PVY^O lub PVY^{NW}, w porównaniu z koncentracją tych izolatów w roślinach porażonych pojedynczo.

Również w roślinach tytoniu obecność izolatu PVY^{NTN} powodowała istotne obniżenie zawartości izolatów PVY^{OLi} i PVY^{NW-FrKV2}, nie miała natomiast wpływu na koncentrację izolatu PVY^{N-Wi}Wy.

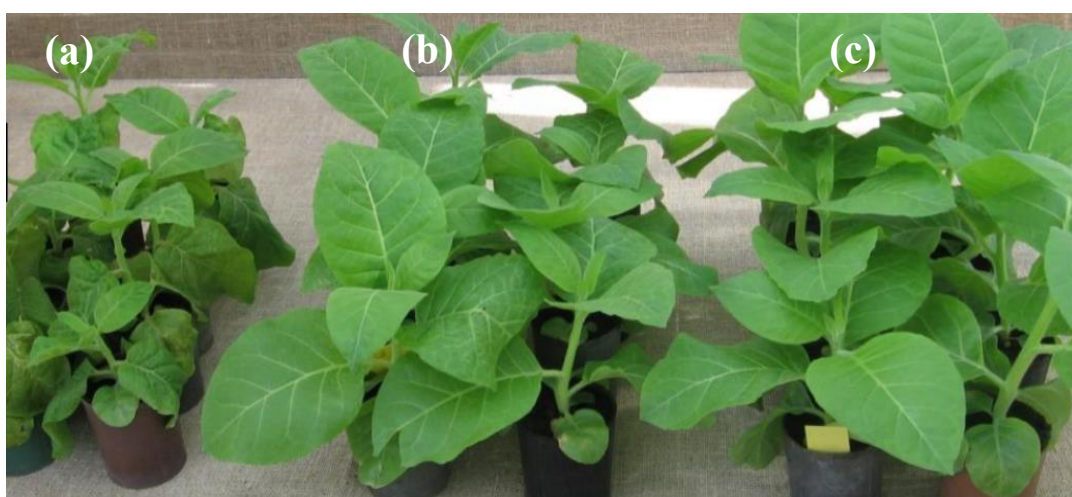
Wstępne wyniki badań potwierdziły hipotezę o istnieniu antagonistycznych interakcji między izolatami PVY w pojedynczej roślinie ziemniaka lub tytoniu (**Publikacja III**). Stwierdzono, że interakcje między izolatami PVY mogą mieć wpływ na efektywność przenoszenia wirusa przez mszyce. Generalnie, pojedyncze osobniki mszycy *M. persicae* najefektywniej przenosiły izolaty NTN, niezależnie od tego, czy rośliny źródłowe były nimi porażone pojedynczo (36-60%), czy w infekcjach mieszanych z izolatami typu O, N:O, N-Wi

(28-56%). Najslabiej przenoszone były izolaty szczepu O, zwłaszcza nabywane przez mszyce z roślin porażonych również izolatami NTN (0-4%). Potwierdzono hipotezę zakładającą, że pojedyncze osobniki mszyc były zdolne do jednoczesnego przenoszenia dwóch izolatów PVY.

W kolejnym etapie badań przedstawiono pogłębioną charakterystykę antagonistycznych interakcji między izolatami PVY w infekcjach mieszanych z wykorzystaniem metod molekularnych, serologicznych, biologicznych i immunofluorescencyjnych (**Publikacja IV**). Szczególną uwagę zwrócono na możliwość występowania zjawiska wykluczenia nadkażenia między izolatami wprowadzanymi do roślin sekwencyjnie w odstępach 3 i 7 dni.

Uzyskano mocne potwierdzenie wcześniejszych wyników, wskazujących na występowanie silnie antagonistycznych interakcji między różnymi genetycznie izolatami PVY.

Symptomy porażenia na roślinach inokulowanych dwoma izolatami PVY były zróżnicowane i zależały głównie od kombinacji izolatów, lecz także od kolejności inokulacji. Uzyskano potwierdzenie hipotezy, że między izolatami PVY w roślinach tytoniu i ziemniaka występuje zjawisko wykluczenia nadkażenia. Na roślinach tytoniu inokulowanych najpierw słabo wirulentnym izolatem PVY^OLi, a po 3 dniach bardzo wirulentnym izolatem PVY^{NTN}Cou8/03 zaobserwowano wyraźnie łagodniejsze objawy infekcji, niż na roślinach inokulowanych jednocześnie obydwoma izolatami. Jeszcze większą różnicę w objawach stwierdzono po zastosowaniu 7-dniowego odstępu między inokulacjami (Rys. 5).

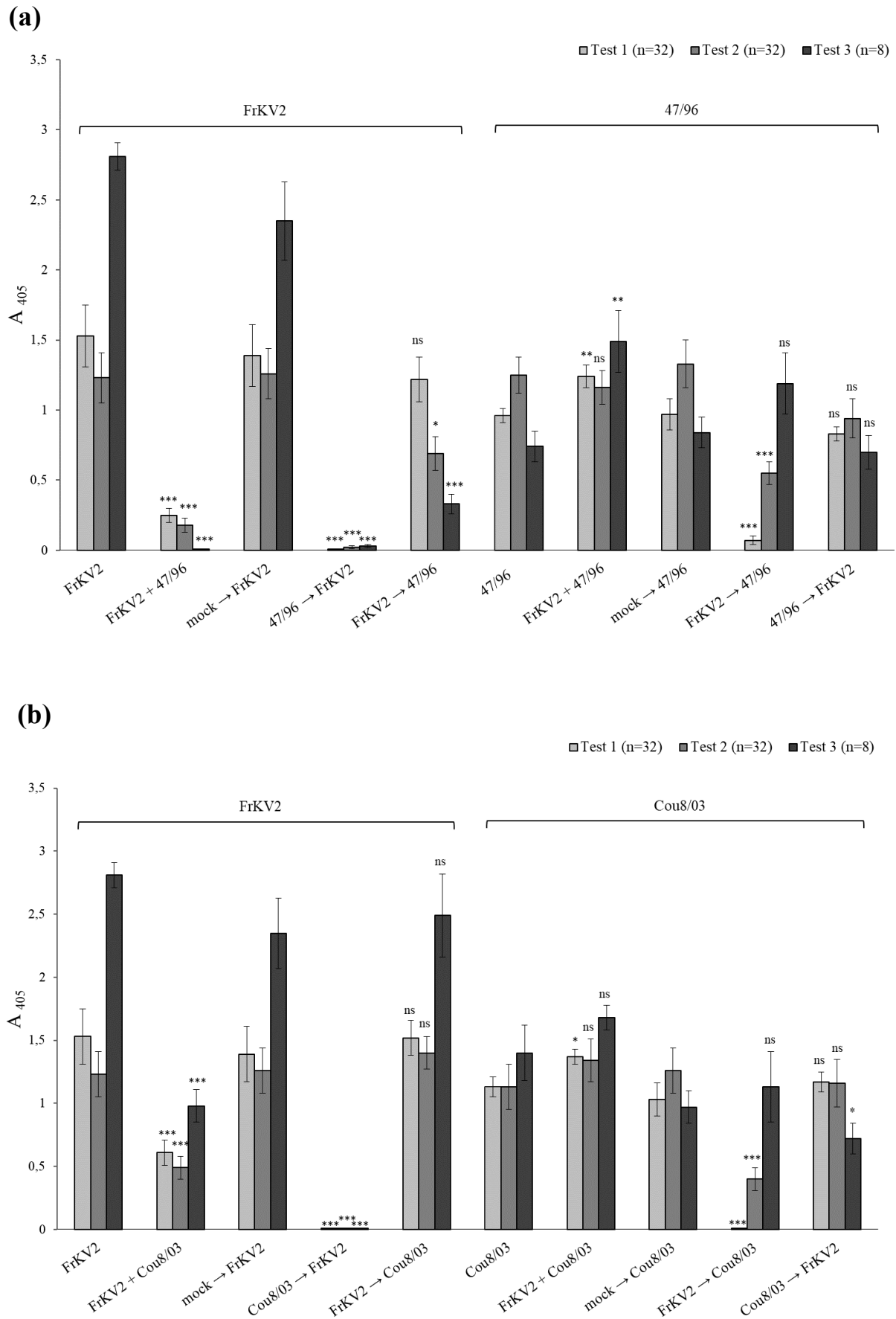


Rys. 5. Objawy infekcji PVY na roślinach tytoniu odm. Samsun inokulowanych: (a) inokulum mieszanym ^OLi + ^{NTN}Cou8 /03, (b) izolatem ^OLi, a po 3 dniach ^{NTN}Cou8 /03, (c) izolatem ^OLi, a po 7 dniach ^{NTN}Cou8 /03.

Interakcje o identycznym charakterze wystąpiły także w roślinach tytoniu po zastosowaniu innych par izolatów o różnej wirulencji, a mianowicie PVY^OLi vs PVY^{NTN}47/96 oraz PVY^{N-Wi}Wy vs izolat NTN. Również w przypadku ziemniaka zaobserwowano, że na roślinach inokulowanych najpierw izolatem PVY^OLi lub PVY^{N-Wi}Wy, a następnie izolatem NTN występowały znacznie łagodniejsze objawy porażenia, niż na roślinach inokulowanych samym izolatem NTN.

Wykazano, że pierwotna infekcja roślin tytoniu lub ziemniaka którymkolwiek z izolatów NTN skutecznie ograniczała namnażanie izolatu o serotypie O we wtórnej infekcji. Nie stwierdzono natomiast wpływu wtórnej inokulacji którymś z tych izolatów na akumulację izolatów NTN.

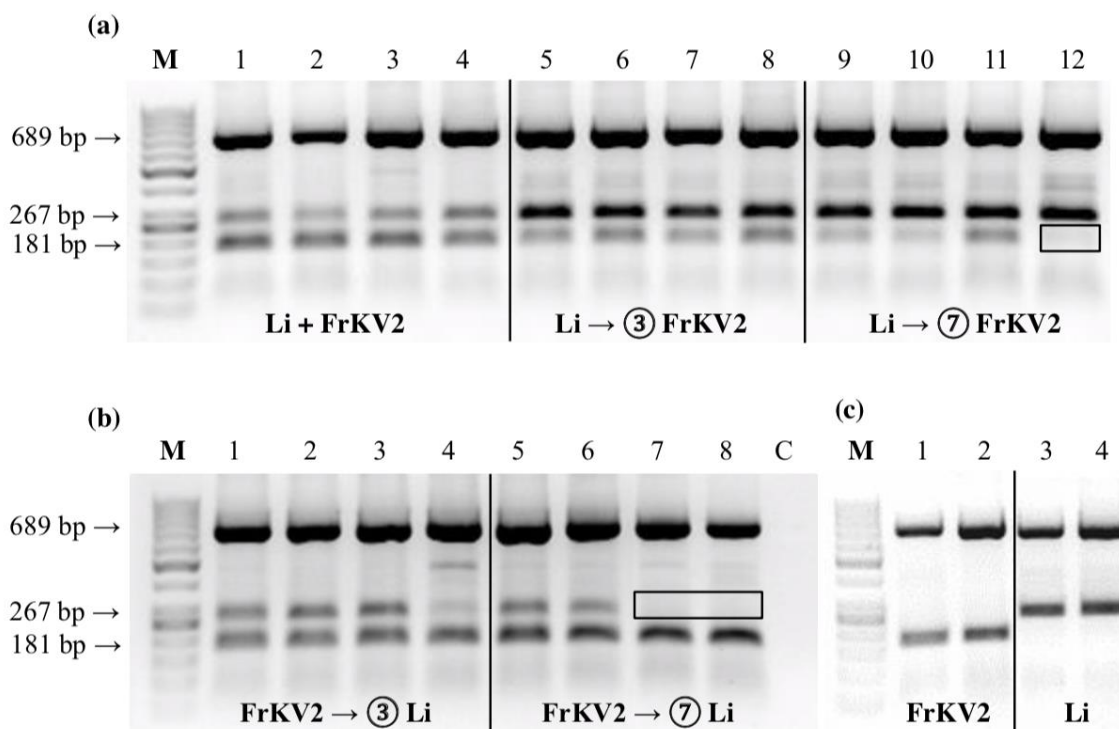
W roślinach inokulowanych najpierw izolatami o serotypie O, a następnie izolatem NTN, stwierdzono istotny niekiedy wpływ interakcji między izolatami na zawartość wirusa. Przy tej kolejności inokulacji stopień redukcji zawartości wirusa w badanych próbach zależał od: (i) kombinacji izolatów, (ii) gatunku rośliny gospodarza, (iii) odstępu czasu między inokulacjami (3 lub 7 dni) oraz (iv) okresu czasu od inokulacji do pobrania prób do testu ELISA (Rys. 6).



Rys. 6. Średnie wartości absorbancji A_{405} w teście ELISA (a) N° FrKV2 i N^{TN} 47/96, (b) N° FrKV2 i N^{TN} Cou8/03, w pojedynczo i podwójnie (jednocześnie (+) lub sekwencyjnie inokulowanych roślinach tytoniu. Miana mierzono 3, 4 i 5 tygodni po inokulacji pierwotnej (testy 1–3). Zastosowano 7- dniowy

odstęp między inokulacjami. Symbole *, ** i *** wskazują istotność różnic w wartościach A_{405} przy $P < 0,05$, $P < 0,01$ i $P < 0,001$, zgodnie z testem t-Studenta. ns – różnica nieistotna.

Zastosowanie technik multiplex RT-PCR i duplex RT-qPCR pozwoliło zaobserwować zjawisko konkurencji również między izolatami o serotypie O. Obecność w tkankach rośliny izolatu PVY^{N:O}FrKV2 wpływała wyraźnie hamująco na namnażanie i akumulację izolatu PVY^OLi (Rys. 7).



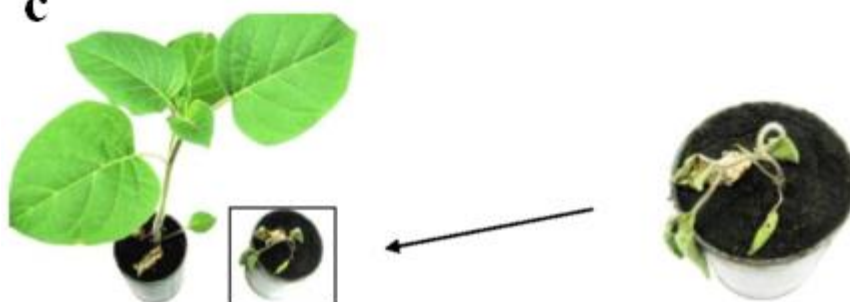
Rys. 7. Wykrywanie za pomocą RT-PCR izolatów PVY o serotypie O w podwójnie inokulowanych roślinach ziemniaka odm. Irga. (a) 1–4 rośliny inokulowane jednocześnie izolatami ^OLi i ^{N:O}FrKV2, 5–8 rośliny inokulowane najpierw ^OLi, a po 3 dniach ^{N:O}FrKV2, 9–12 rośliny inokulowane najpierw ^OLi, a po 7 dniach ^{N:O}FrKV2 (b): 1–4 rośliny inokulowane najpierw ^{N:O}FrKV2, a po 3 dniach ^OLi, 5–8 rośliny inokulowane najpierw ^{N:O}FrKV2, a po 7 dniach ^OLi (c): 1–2 rośliny inokulowane pojedynczo ^{N:O}FrKV2, 3–4 rośliny inokulowane pojedynczo ^OLi. M- drabinka 100 bp DNA, C - kontrola negatywna. Test przeprowadzono 4 tygodnie po inokulacji. Prostokątne ramki podkreślają brak oczekiwanych produktów reakcji RT-PCR.

Wyniki oceny immunofluorescencji w tkankach inokulowanych roślin były generalnie zgodne z wynikami testu ELISA. Czerwona fluorescencja, wskazująca na obecność izolatów NTN, dominowała nad zieloną fluorescencją, emitowaną przez izolaty o serotypie O. Stwierdzono ponadto różnice w lokalizacji tych izolatów w tkankach roślin. Zarówno dominacja izolatów NTN jak i separacja przestrzenna izolatów

PVY o różnym serotypie były szczególnie wyraźnie widoczne w próbach z roślin, wobec których zastosowano 7-dniowy odstęp czasu między inokulacjami.

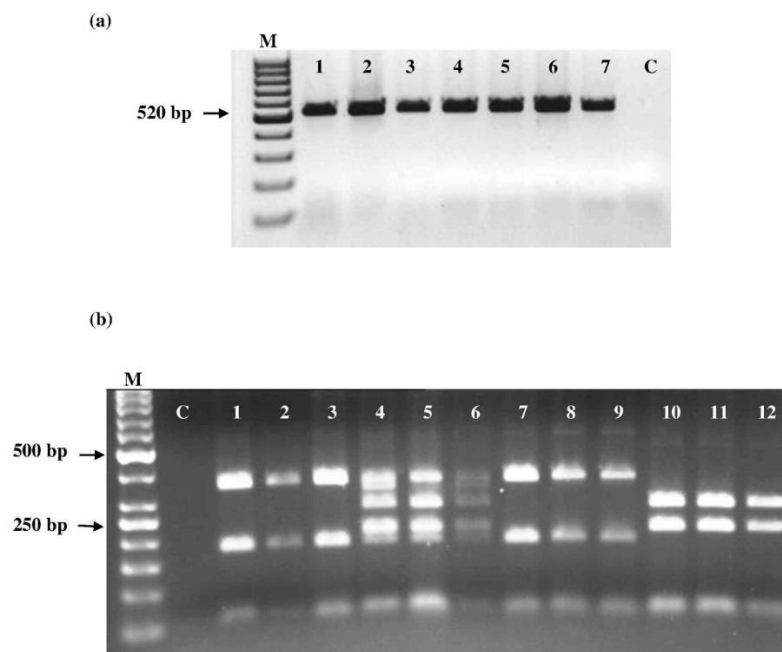
Uzyskane wyniki potwierdziły hipotezę, że efekt rywalizacji między izolatami PVY zależy od kondycji/zdolności przystosowawczej (ang. *fitness*) izolatu i od terminu powstania infekcji lub wykonania inokulacji każdym z pary izolatów PVY. Ponadto, efekty koinfekcji zależały zarówno od izolatu jak i gatunku rośliny gospodarza.

W przypadku interakcji między izolatami PVM wykazano antagonistyczne wzajemne oddziaływanie słabo wirulentnego izolatu I-38 i bardzo wirulentnego izolatu Uran w roślinach *D. metel* inokulowanych obydwoma izolatami równocześnie lub w odstępie 7 dni (**Publikacja V**; Rys. 8).

a**b****c**

Rys. 8. Objawy infekcji PVM na roślinach *Datura metel* inokulowanych: (a) Panel górny- izolatem I-38 (lewa strona) i inokulum mieszanym I-38 + Uran (prawa strona); panel dolny: izolatem I-38, a po 7 dniach izolatem Uran (lewa strona), i izolatem Uran (prawa strona). (b) Roślina inokulowana tylko izolatem I-38. (c) Lewa roślina inokulowana I-38, a po 7 dniach izolatem Uran, prawa roślina inokulowana tylko izolatem Uran.

Występowanie zjawiska wykluczenia nadkażenia między izolatami PVM I-38 i Uran wykazano dzięki zastosowaniu metody RT-PCR-RFLP (Rys. 9).



Rys.9. Wykrywanie izolatów I-38 i Uran z zastosowaniem RT-PCR i RT-PCR-RFLP w roślinach *Datura metel* inokulowanych jednym lub dwoma izolatami. (a) M drabinka 100 bp DNA, 1 tylko I-38, 2 tylko Uran, 3-5 I-38 + Uran, 6-7 I-38 i Uran (7-dniowy odstęp czasowy), C kontrola negatywna. (b) M drabinka 1000 bp DNA, C kontrola negatywna, 1-3 tylko I-38, 4-6 I-38 + Uran, 7-9 I-38 i Uran (7-dniowy odstęp czasowy), 10-12 tylko Uran.

Sekwencje: nukleotydową genu białka płaszczka (CP) i aminokwasową CP izolatu I-38 porównano z sekwencją CP izolatu Uran. Stwierdzono wysoki stopień homologii (97%) w sekwencji nukleotydowej CP pomiędzy obydwoima izolatami. Dalsza analiza wykazała różnice aminokwasowe w trzech pozycjach.

Według najlepszej wiedzy autorów pracy, zjawisko konkurencji między izolatami PVM w roślinie gospodarzu nie było wcześniej publikowane w literaturze światowej.

Warto podkreślić, że rozwój wiedzy o wzajemnym oddziaływaniu wirusów stwarza szansę wyjaśnienia patogenezy powodowanych przez nie chorób, a wiedza ta może okazać się nieoceniona przy opracowywaniu efektywnych strategii ich zwalczania.

PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

W pracach przedstawionych w rozprawie wykazano, że wewnątrzgatunkowe interakcje między różnymi genetycznie izolatami PVY i PVM w infekcjach mieszanych mają charakter antagonistyczny. Cel badań został w pełni osiągnięty, bowiem za pomocą zróżnicowanych metod diagnostycznych dowiedziono istnienia silnej konkurencji między izolatami PVY w infekcjach mieszanych (**Publikacje III i IV**). Dowiedziono również, że wewnątrzgatunkowa konkurencja może występować w obrębie PVM (**Publikacja V**).

- Wykazano, że w roślinach ziemniaka i tytoniu zakażonych równocześnie bądź w odstępie 3 lub 7 dni dwoma izolatami PVY jeden izolat ograniczał namnażanie i akumulację drugiego izolatu.
- Efekt rywalizacji zależał od kondycji/zdolności przystosowawczej (ang. *fitness*) izolatu i od terminu zaistnienia infekcji lub wykonania inokulacji każdym z pary izolatów PVY. Stwierdzono znaczną dominację izolatów NTN nad izolatami o serotypie O.
- Konsekwencją antagonistycznych interakcji między izolatami PVY było intensywniejsze namnażanie się izolatów typu NTN, w porównaniu z izolatami o serotypie O. Genotyp wirusa, który ma przewagę nad konkurentami w szybkości namnażania i przemieszczania w komórkach gospodarza, wydajniej wykorzystuje jego zasoby i szybciej dokonuje inwazji organizmu żywiciela.
- Pojedyncze mszyce gatunku *Myzus persicae* były zdolne do równoczesnego nabywania i przenoszenia dwóch izolatów PVY, co może zwiększać dynamikę rekombinacji i rozprzestrzeniania się wirusa w uprawach ziemniaka, tytoniu lub innych roślin z rodziny Solanaceae.
- Znakowanie fluorescencyjne różnych izolatów PVY umożliwiło obserwacje mikroskopowe zjawiska oddzielenia przestrzennego izolatów NTN od izolatów o serotypie O w tkankach gospodarza. Kolonizacja różnych przestrzeni komórkowych niewątpliwie ogranicza możliwość konkurowania ze sobą różnych genetycznie wariantów tego samego wirusa. Z ewolucyjnego punktu widzenia zjawisko to wydaje się być korzystne, sprzyja bowiem zachowaniu różnorodności w obrębie populacji wirusa.

- **Publikacja V** jest pierwszym w literaturze światowej doniesieniem o możliwości występowania zjawiska konkurencji między izolatami PVM w komórkach rośliny gospodarza. Wykazano, że infekcja łagodnym izolatem całkowicie lub częściowo chroniła rośliny *D. metel* przed infekcją bardziej wirulentnym izolatem wirusa.

LITERATURA

- Claus C, Tzeng WP, Liebert UG, Frey TK. (2007) *Rubella virus*-induced superinfection exclusion studied in cells with persisting replicons. *Journal of General Virology* 88: 2769–2773.
- Fang X, Qi Y. (2016) RNAi in plants: an argonaute-centered view. *Plant Cell* 28: 272–285.
- Folimonova SY. (2013) Developing an understanding of cross-protection by *Citrus tristeza virus*. *Frontiers in Microbiology* 4: 76.
- Folimonova SY, Harper SJ, Leonard MT, Triplett EW, Shilts T. (2014) Superinfection exclusion by *Citrus tristeza virus* does not correlate with the production of viral small RNAs *Virology* 462–47.
- Gal-On A, Shibolet Y. (2006) Cross protection. *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses*. Loebenstein G, Carr J P. Springer Dordrecht 261–288.
- Grupa A, Syller J. (2015) Mieszane infekcje wirusowe roślin: współdziałanie czy rywalizacja terytorialna między wirusami? *Kosmos* 64: 47–56.
- Huang CY, Lu TY, Bair C H, Chang YS, Jwo JK, Chang W. (2008) A novel cellular protein, VPEF, facilitates vaccinia virus penetration into HeLa cells through fluid phase endocytosis. *Journal of Virology* 82: 7988–7999.
- Hull R. (2014) Movement of viruses within plants. *Plant Virology* 531–603.
- Kobiler O, Lipman Y, Therkelsen K, Daubechies I, Enquist LW. (2010) Herpesviruses carrying a Brainbow cassette reveal replication and expression of limited numbers of incoming genomes. *Nature Communication* 1:146.
- Laliberte JP, Moss B. (2014) A novel mode of poxvirus superinfection exclusion that prevents fusion of the lipid bilayers of viral and cellular membranes. *Journal of Virology* 88: 9751–9768.
- Li S, Wang H, Zhou G. (2014) Synergism between Southern rice black -streaked dwarf virus and *Rice ragged stunt virus* enhances their insect vector acquisition. *Phytopathology* 104: 794 - 799.

- Ludlow M, McQuaid S, Cosby SL, Cattaneo R, Rima BK, Duprex WP. (2005) *Measles virus* superinfection immunity and receptor redistribution in persistently infected NT2 cells. *Journal of General Virology* 86: 2291–2303.
- Mascia T, Gallitelli D. (2016) Synergies and antagonisms in virus interactions. *Plant Science* 252: 176–192.
- Nishiguchi M, Kobayashi K. (2011) Attenuated plant viruses: preventing virus diseases and understanding the molecular mechanism. *Journal of General Plant Pathology* 77: 221–229.
- Niehl A, Heinlein M. (2010) Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* 248: 75–99.
- Pallas V, García JA. (2011) How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *Journal of General Virology* 92: 2691–2705.
- Pechinger K, Moon Choi K, MacDiarmid RM, Harper SJ, Ziebell H. (2019) A new era for mild strain cross-protection. *Viruses* 11, 670; doi:10.3390/v11070670
- Syller J, Grupa A. (2016) Antagonistic within-host interactions between plant viruses: molecular basis and impact on viral and host fitness. *Molecular Plant Pathology* 17: 769–782.
- Syller J. (2012) Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular Plant Pathology* 13: 204–16.
- Tscherne DM, Evans MJ, von Hahn T, Jones CT, Stamataki Z, McKeating JA, Lindenbach BD, Rice CM. (2007) Superinfection exclusion in cells infected with *hepatitis C virus*. *Journal of Virology* 81:3693–3703.
- Turco S, Golyaev V, Seguin J, Gilli C, Farinelli L, Boller T, Schumpp O, Pooggin MM. (2018) Small RNA-omics for virome reconstruction and antiviral defense characterization in mixed infections of cultivated *Solanum* plants. *Molecular Plant Microbe Interactions* 31: 707–723.
- Zhang H, Tan X, He Y, Xie K, Li L, Wang R, Hong G, Li J, Li J, Taliansky M, MacFarlane S, Yan F, Chen J, Sun Z. (2019) Rice black -streaked dwarf virus P10 acts as either a synergistic or an antagonistic determinant during superinfection with related or unrelated virus. *Molecular Plant Pathology* doi: 10.1111/mpp.12782.

Zhang X F, Sun R, Guo Q, Zhang S, Meulia T, Halfmann R, Li D, Qu F. (2017) A self-perpetuating repressive state of a viral replication protein blocks superinfection by the same virus. *PLOS Pathogens*. 13:e1006253.

Ziebell H, Carr JP. (2010) Cross protection: a century of mystery. *Advances in Virus Research* 76: 211–264.