

Załącznik 2: AUTOREFERAT (Tłumaczenie z języka angielskiego)

Studium interakcji wirusa Y ziemniaka z ziemniakiem i tytoniem

1. Imię i nazwisko	2
2. Posiadane dyplomy / stopnie naukowe	2
3. Przebieg zatrudnienia w jednostkach naukowych	2
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy	2
a) Tytuł osiągnięcia	2
b) Osiągnięcie stanowi jednotematyczny cykl następujących publikacji	2
c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	3
<i>Krótkie wprowadzenie</i>	4
<i>Cel naukowy</i>	5
<i>Wyniki badań</i>	5
<i>I. Badania patogenu – PVY</i>	5
I.1 Zmiany w populacji PVY i chrakteryzowanie szczepów PVY występujących w Polsce	5
I.2 Charakteryzowanie trzech izolatów PVY z wykorzystaniem odmian indykatorowych ziemniaka, roślin testowych tytoniu oraz wykonanie sekwencjonowania całego genomu	7
I.3 Porównanie HC-Pro w trzech izolatach PVY	8
I.4 Podsumowanie badań szczepów PVY	10
<i>II. Badania gospodarza – ziemniaka i tytoniu</i>	11
II.1 Ocena odporności odmian ziemniaka oraz ich reakcji na izolaty PVY	11
II.2 Szczepowo-specyficzna odporność na PVY typu HR w odmianie Etola	11
II.3 Podsumowanie badań odmian ziemniaka i tytoniu jako gospodarzy PVY	12
<i>III. Badanie interakcji gospodarz – wirus Y ziemniaka, PVY</i>	12
III.1 Interakcja gospodarz – wirus Y ziemniaka z uwzględnieniem roli cząsteczek miRNA – hipoteza	12
III.2 Specyficzna dla szczepu zmiana miRNA i ich cząsteczek docelowych w inokulowanym PVY ziemniaku odmiany Etola	13
III.3 Zależne od szczepu zmiany ekspresji cząsteczek miRNA i ich cząsteczek docelowych w roślinach tytoniu cv. Samsun zakażonych PVY	14
III.4 Zależna od gospodarza, specyficzna dla szczepu PVY zmiana ekspresji miRNA	15
III.5 Specyficzna dla szczepu PVY zmiana poziomu ekspresji miRNA gospodarza jest związana z odpowiedzią obronną	16
III.6 Specyficzna dla szczepu PVY zmiana poziomu ekspresji miRNA i cząsteczek docelowych jest związana z poziomem PVY RSS HC-Pro	16
III.7 Specyficzna dla szczepu PVY zmiana poziomu ekspresji miRNA jest związana z nasileniem objawów	16
III.8 Możliwy udział białka HC-Pro PVY w rozwoju objawów i odpowiedzi obronnej	17
III.9 Podsumowanie badań interakcji PVY-gospodarz	18
III.10 Wnioski z badań miRNA	18
<i>Możliwości zastosowania badań nad wirusem PVY, gospodarzem i interakcją patogen-gospodarz</i>	18
<i>Skróty</i>	19
<i>Literatura</i>	20
5. Pozostałe osiągnięcia badawcze i rozwojowe	24

AUTOREFERAT
(Tłumaczenie z języka angielskiego)

1. Imię i nazwisko

Zhimin Yin

2. Posiadane dyplomy / stopnie naukowe

- 1983-1987 Stopień inżyniera agronomii z wyróżnieniem.
Uniwersytet Rolniczy w Hebei, Wydział Agronomii, Baoding, Chińska Republika Ludowa.
Praca inżynierska pt „Analiza cech agronomicznych pszenicy w pokoleniu F1” (w j. chińskim). Opiekun Profesor Zongzhi Li.
- 1997-1998 Magister inżynier ogrodnictwa (eksternistycznie)
Wydział Ogrodniczy SGGW w Warszawie.
Praca magisterska pt. “Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) with *PR-2d/uidA* reporter gene construct” (w j. angielskim). Opiekun prof. dr hab. Stefan Malepszy.
- 1998-2002 Doktor nauk rolniczych w zakresie ogrodnictwa.
Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, SGGW w Warszawie.
Rozprawa doktorska pt. “Analysis of transgenic cucumber plants containing *PR-2d uidA* and *p35S CaMV* thaumatin constructs” (w j. angielskim). Promotor prof. dr hab. Stefan Malepszy.

3. Przebieg zatrudnienia w jednostkach naukowych

- 1987-1998 Instytut Bawełny, Akademii Rolniczej i Leśnej w Hebei, Shijiazhuang, Chińska Republika Ludowa, asystent
- 2003-2008 Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu, adiunkt
- 2008 – do dziś Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - PIB, Oddział w Młochowie, Zakład Genetyki i Materiałów Wyjściowych Ziemniaka, Pracownia Fitopatologii, adiunkt.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego - Zgodnie z art. 179 ustawy z 3 lipca 2018 r. – Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30.08.2018 r., poz. 1669) - z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789)

a) Tytuł osiągnięcia:

Studium interakcji wirusa Y ziemniaka z ziemniakiem i tytoniem

b) Osiągnięcie stanowi jednotematyczny cykl następujących publikacji:

H1. Yin Z, Chrzanowska M, Michalak K, Zagórska H, Zimnoch-Guzowska E (2012) Recombinants of PVY strains predominate among isolates from potato crop in Poland. *J. Plant Prot. Res.* 52: 214-219.

(punkty MNiSzW₂₀₁₂: **9**)

Mój udział polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaprojektowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów, analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu i wynosił 60%.

H2. Zimnoch-Guzowska E, **Yin Z**, Chrzanowska M, Flis B (2013) Sources and effectiveness of potato PVY resistance in IHAR's breeding research. *Am. J. Potato Res.* 90: 21-27.

(IF₂₀₁₃ **0,951**; punkty MNiSzW₂₀₁₃: **30**)

Mój udział polegał na zaplanowaniu badań struktury populacji PVY oraz oceny odporności odmian na PVY oraz przygotowaniu manuskryptu podrozdziałów: Structure of PVY Population in Poland i Evaluation of Potato Cultivars registered in Poland i wynosił 40 %.

H3. Yin Z, Xie F, Michalak K, Pawełkiewicz M, Zhang B, Murawska Z, Lebecka R, Zimnoch-Guzowska E (2017) Potato cultivar Etola exhibits hypersensitive resistance to PVY^{NTN} and partial resistance to PVY^{Z-NTN} and PVY^{N-Wi} strains and strain-specific alterations of certain host miRNAs might correlate with symptom severity. *Plant Pathol.* 66: 539-550.

(IF₂₀₁₇ **2,303**; punkty MNiSzW₂₀₁₇: **35**)

Mój udział polegał na stworzeniu koncepcji badań i zaprojektowaniu eksperymentów. Ponadto miałam wiodący udział w przeprowadzeniu badań molekularnych i biologicznych, analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu. Kierowałam projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy. Mój udział w publikacji oceniam na 50%.

H4. Yin Z, Murawska Z, Xie F, Pawełkiewicz M, Michalak K, Zhang B, Lebecka R (2018) microRNA response in potato virus Y infected tobacco shows strain-specificity depending on host and symptom severity. *Virus Res.* <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.11.002>. (*Virus Res.* 2019. 260: 20-32)

(IF₂₀₁₇ **2,484**; punkty MNiSzW₂₀₁₇: **25**)

podano IF z roku 2017, gdyż dane za rok 2018 nie były jeszcze dostępne

Mój udział polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaprojektowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów, analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu. Kierowałam projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy. Mój udział w publikacji oceniam na 50%.

H5. Yin Z (2018) Host miRNAs and virus-derived small RNAs in plants infected with certain potyviruses. In *Plant Viruses: Diversity, Interaction and Management*, eds. RK Gaur, SMP Khurana, and Y Dorokhov. Boca Raton, FL: CRC Press. Chapter 17, pp 279-299. (w jęz. angielskim).

(punkty MNiSzW₂₀₁₈: **5**)

Mój udział polegał na stworzeniu koncepcji napisania rozdziału oraz przygotowaniu tego manuskryptu i wynosił 100%.

- c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Krótkie wprowadzenie

Ziemniak (*Solanum tuberosum* L.) jest czwartym pod względem znaczenia gatunkiem rolniczym uprawianym na świecie po pszenicy, ryżu i kukurydzy. Polska jest największym producentem ziemniaków w Europie Środkowo-Wschodniej, ze zbiorem około 8 mln ton rocznie (Dzwonkowski, 2018). W 2018 roku statystyczny Polak zjadał 75,2 kg ziemniaków nieprzetworzonych, co wskazuje na wysokie spożycie ziemniaków w Polsce (Dzwonkowski i in., 2018). Ziemniak jest rozmnażany wegetatywnie, co powoduje jego łatwiejsze podleganie infekcjom wirusowym. W Polsce największe znaczenie ekonomiczne w produkcji ziemniaka ma wirus Y ziemniaka (*Potato virus Y*, PVY) (Kostiw, 2011). Straty w plonie bulw powodowane infekcją PVY są znaczne, a jakość bulw bywa obniżona poprzez występowanie pierścieniowych nekroz (*potato tuber necrotic ringspot disease*, PTNRD) wywołanych przez szczep PVY^{NTN} (Kehoe i Jones, 2011). PVY jest przenoszony do rośliny przez mszyce w sposób nietrwały, w kilka godzin po jego pozyskaniu (Hussain i in., 2016). Takiemu sposobowi przenoszenia wirusa nie można zapobiec przez użycie środków chemicznych przeciw mszycom, ponieważ nie działają wystarczająco szybko i w odpowiednim momencie. Hodowla odpornościowa na choroby wirusowe jest najlepszym sposobem ochrony. Są dwa typy odporności na PVY w ziemniaku, skrajna (ekstremalna) odporność (*extreme resistance*, ER) i odporność w oparciu o nadwrażliwość (*hypersensitive resistance*, HR) (patrz artykuł przeglądowy Valkonen, 2015). ER hamuje namnażanie wirusa w pierwszych zainfekowanych komórkach. HR ogranicza wirusa w znekrotyzowanej tkance w miejscu infekcji i zapobiega rozprzestrzenianiu się wirusa do innych części rośliny. Geny określone jako *Ry* warunkują ER przeciwko wszystkim szczepom PVY, podczas gdy geny HR (*N*) są szczepowo-specyficzne.

PVY jest zaliczany do 10 najważniejszych wirusów w molekularnej patologii roślin i jest typowym przedstawicielem rodzaju *Potyvirus* (Scholthof i in., 2011). PVY posiada genomowe, jednoniciowe RNA (ssRNA) o długości ok. 9700 nukleotydów i zasadniczo jest klasyfikowany w pięciu szczepach, które różnią się zdolnością do wywoływania HR w różnicujących (indykatorowych) odmianach ziemniaka posiadających specyficzne geny HR (*N*), np. odmiana King Edward (*Nc:ny:nz*), odm. Désirée (*nc:Ny:nz*) i odm. Pentland Ivory (*Nc:Ny:Nz*) (Singh i in., 2008). Szczepy PVY, które wywołują HR u form z genami *Ny*, *Nc* oraz *Nz* są klasyfikowane, odpowiednio, jako szczepy PVY^O, PVY^C i PVY^Z. Szczepy PVY, które przełamują odporność warunkowaną trzema genami HR są klasyfikowane jako szczepy nekrotyczne PVY^N, jeśli powodują nekrozy nerwów (*veinal necrosis*, VN) w liściach tytoniu, lub PVY^E, jeśli nie wywołują VN w tytoniu. Szczepy PVY^C, PVY^O i PVY^Z nie powodują VN na tytoniu. Warianty PVY: PVY^{N-Wi} oraz PVY^{NTN} należą do szczepu PVY^N. PVY^{N-Wi} i PVY^{NTN} mają genom zrekombinowany pomiędzy genomami PVY^N i PVY^O. PVY^{Z-NTN} należy do szczepu PVY^Z. Na poziomie sekwencji RNA, szczep PVY^{Z-NTN} jest tożsamy ze szczepem PVY^{NTN}. Oba szczepy PVY^{NTN} i PVY^{Z-NTN} wywołują pierścieniowe nekrozy na bulwach (PTNRD) wrażliwych odmian ziemniaka i powodują spadek jakości bulw.

Wiedza o mechanizmach obrony roślin przed czynnikami biotycznymi, m.in. infekcjami wirusowymi, poszerza się po odkryciu genów kodujących mikroRNA (*microRNA*, miRNA). Odkryto je we wszystkich testowanych do tej pory eukariotach. miRNA w różnych organizmach są wysoce konserwatywne. Roślinne miRNA są endogennymi niekodującymi RNA o długości 20-24 nt, które po transkrypcji regulują ekspresję genu eukariotycznego przez celowanie w specyficzne mRNA (*messenger RNA*, mRNA) w celu jego cięcia lub inhibicji translacji (Bartel, 2004; Voinnet, 2009). Odgrywają istotne role w rozwoju roślin oraz w ich reakcjach na stresy abiotyczne i biotyczne, zaliczając do nich m.in. infekcję przez wirusy

(Jones-Rhoades i in., 2006; Khraiweshi i in., 2012; Jin i in., 2013; **Yin i in., 2014 c** patrz **Załącznik 4**). Niektóre miRNA są zaangażowane w mechanizm odporności na wirusy poprzez regulację w roślinach ekspresji genów odporności (genów *R*), które kodują białka zawierające sekwencje wiązania nukleotydów (NBS) i powtórzenia bogate w leucynę (LRR) (*proteins containing nucleotide binding site and leucine-rich repeat domains*, NBS-LRR) (Li i in., 2012; Shivaprasad i in., 2012).

W napisanym przeze mnie rozdziale książki (**H5**, punkt 4.b autoreferatu) podsumowałam, między innymi, znalezione eksperymentalnie miRNA gospodarza i ekspresję ich targetowych mRNA w różnych gatunkach roślin w odpowiedzi na PVY (Tabela 17.2 w **H5**).

Cel naukowy

Publikacje naukowe, które wchodzą w skład osiągnięcia habilitacyjnego mają następujące cele badawcze:

- (1) monitoring zmian w populacji PVY w uprawach ziemniaka w Polsce i scharakteryzowanie zidentyfikowanych szczepów tego wirusa (**H1** i **H2**, punkt 4.b autoreferatu);
- (2) ocena odporności odmian ziemniaka i ich reakcji na różne izolaty PVY (**H2**);
- (3) w ramach poznania interakcji PVY – gospodarz, zbadanie profili ekspresyjnych grupy reagujących na stres miRNA gospodarza w patosystemach PVY-ziemniak (**H3**) oraz PVY-tytoń (**H4**).

Wyniki badań

W publikacji **H1**, w której jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem, 282 izolaty PVY zostały scharakteryzowane biologicznie, serologicznie i zakwalifikowane do szczepów PVY.

Publikacja **H2**, w której jestem współautorem, opisuje zmiany w populacji PVY w Polsce oraz przedstawia reakcję odpornościową na cztery izolaty PVY 113 odmian ziemniaka.

Wyniki przedstawione w publikacjach **H1** i **H2** były uzyskane częściowo w ramach projektu 3-6-00-0-01 (2008-2013) i/lub projektu 3-1-06-0-01 (2008-2013), finansowanych przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, w których byłam głównym wykonawcą pracując nad kolekcją wirusowych patogenów ziemniaka oraz monitorując wirusy ziemniaka w Polsce (patrz **Załącznik 4**).

Publikacje **H3** i **H4**, w których jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem, opisują profile ekspresyjne reagujących na stres miRNA gospodarza w interakcjach patosystemów PVY- ziemniak i PVY-tytoń; przedstawiają sekwencje całych genomów trzech izolatów PVY oraz ich przynależność do szczepów PVY wykonaną przy użyciu różnicujących odmian ziemniaka.

Wyniki publikacji **H3** i **H4** były uzyskane w trakcie realizacji dwóch projektów, którymi kierowałam, tj. NN310 304439 (2010-2013) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki oraz Tematu 95 (2015-2017) finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi (patrz **Załącznik 4**).

I. Badania patogenu – PVY

1.1 Zmiany w populacji PVY i chakteryzowanie szczepów PVY występujących w Polsce

Ostatnie badania wskazują, że warianty rekombinantów PVY są powszechne w populacjach PVY występujących na ziemniakach na całym świecie. W Wielkiej Brytanii molekularne badanie różnicowania PVY wykazało, że 80-90% populacji należy do zrekombinowanej europejskiej grupy PVY^{NTN} (Davie i in., 2017). W Stanach Zjednoczonych obserwuje się wzrost częstości występowania zrekombinowanych szczepów PVY^{N-Wi} z mniej niż 27% w 2011 r. do 53% w 2015 r. (Funke i in., 2017). Historycznie, w Polsce zidentyfikowano pierwszy izolat PVY^{N-Wi} (o nazwie Wi) w zachodniej Polsce w 1984 r. na ziemniaku odmiany Wilga (Chrzanowska, 1991), a pierwszy izolat PVY^{NTN} (nazwany 12/94) wykryto na chwytниковej roślinie tytoniu wystawionej w uprawę ziemniaków w Młochowie w 1994 r. (Chrzanowska i Doroszevska, 1997). W 2018 r., test na chwytниковych roślinach tytoniu w uprawie ziemniaków w Młochowie wykazał, że szczepy PVY^{N-Wi} i PVY^{NTN} stanowiły odpowiednio 59% i 17% populacji PVY (Yin i in., nieopublikowane).

Monitoring populacji PVY w Młochowie (środkowa Polska) prowadzony jest w sposób ciągły od 1980 roku, a rośliny chwytниковe tytoniu (odmiany Samsun) w okresie 1980-2010 umieszczane były na polach ziemniaczanych, przeważnie co drugi rok (**H2**). Ponadto, scharakteryzowano serologicznie i biologicznie 282 izolatów PVY, które zebrano z upraw ziemniaków w północnej i centralnej Polsce w latach 1995-2009 (**H1**). Spośród tych 282 izolatów PVY, dodatkowo 112 izolatów zebranych w latach 2006-2009 analizowano za pomocą tripleksowej, jednoetapowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR) (**H1**).

Izolaty PVY zostały sklasyfikowane w szczepy serologicznie w oparciu o immunoenzymatyczny test ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) z zastosowaniem szczepowo-specyficznych przeciwciał monoklonalnych (*monoclonal antibodies*, mAbs) i niespecyficznych przeciwciał (*antibody*, Ab) oraz w oparciu o symptomy wywoływane na tytoniu, jako: PVY^O (serotyp PVY^O, rozjaśnienie nerwów na tytoniu (*vein clearing*, VCl), PVY^N (serotyp PVY^N, nekrozy nerwów na tytoniu (*veinal necrosis*, VN), oraz PVY^{N-Wi} (serotyp PVY^O, VN na tytoniu). Izolaty wykazujące pozytywną reakcję na mAb PVY^N były testowane na wrażliwych odmianach ziemniaka Vital, Igor i Nicola. Izolaty wywołujące nekrozy na bulwach zostały sklasyfikowane jako szczep PVY^{NTN}. Wszystkie testowane izolaty PVY^N indukowały objawy PTNRD, co klasyfikowało je do szczepu PVY^{NTN}.

Jak pokazano w **H2**, we wczesnych latach 80-tych XX wieku szczep PVY^O stanowił aż 85-90% populacji PVY w Polsce, a od 1986 r. jego udział spadł poniżej 10%. W latach 1984-2004 szczep PVY^{N-Wi} dominował w populacji PVY, a następnie jego udział spadł do 32% w 2008. Jednak w roku 2010, PVY^{N-Wi} powtórnie był formą dominującą w populacji i stanowił 62 %. Udział szczepu PVY^{NTN} w populacji PVY stopniowo wzrastał od 1994 roku; w 2004 r. odnotowano szybki wzrost udziału PVY^{NTN}. Szczep ten osiągnął 66% składu populacji PVY w roku 2008. Wśród izolatów testowanych w 2010 roku 14% reagowało pozytywnie z obu przeciwciałami monoklonalnymi specyficznymi dla PVY^N oraz PVY^O, co może wskazywać na wystąpienie infekcji mieszanych.

Jak wykazano w publikacji **H1**, spośród 282 testowanych izolatów PVY, 144 należały do szczepu PVY^{N-Wi}, 126 do szczepu PVY^{NTN} a 12 izolatów do szczepu PVY^O. Serologiczne i biologiczne testy 144 izolatów szczepu PVY^{N-Wi} wykazały, że 100 z nich miało oczekiwany serotyp PVY^O z objawami VN na tytoniu, ale 10 izolatów PVY^{N-Wi} wywoływało objawy VCl na tytoniu. Wszystkie izolaty szczepu PVY^{N-Wi} indukowały silne lokalne zmiany (*local lesions*, LL) na *Chenopodium amaranticolor*. Spośród badanych 126 izolatów szczepu PVY^{NTN}, 76 było typowym serotypem PVY^N z objawami VN na tytoniu, jednak różniły się reakcją na C.

amaranticolor: 13 izolatów nie wywoływało symptomów, 23 izolaty indukowały słabe LL, a 40 izolatów silne LL. Spośród 12 badanych izolatów PVY^O, 4 izolaty wykazały oczekiwany serotyp PVY^O w połączeniu z wywoływaniem objawów VCI na tytoniu. Pozostałe izolaty PVY^{N-Wi}, PVY^{NTN} czy PVY^O były serotypami PVY^N i PVY^O lub wykazywały nieprzewidziane reakcje serologiczne i biologiczne.

W publikacji **H1** ze 112 izolatów testowanych tripleksowym RT-PCR (Rigotti i Gugerli, 2007), 71 izolatów zostało zidentyfikowanych jako szczep PVY^{N-Wi}, 29 izolatów zaliczono do szczepu PVY^{NTN} a 12 izolatów do szczepu PVY^O. Szczep PVY^C nie został znaleziony.

W naszych badaniach struktury populacji PVY w Młochowie w latach 2012 i 2014 uzyskano podobne wyniki, tj. dominującymi szczepami były PVY^{N-Wi} i PVY^{NTN} (**Yin 2017** patrz **Załącznik 4**). Ponadto, podobny trend uzyskano w badaniach z lat 2001-2012 z prób bulw zebranych z ziemniaków produkcyjnych w północnej i środkowej Polsce (**Yin 2017** patrz **Załącznik 4**)

Podsumowując, na podstawie przeprowadzonych badań (**H1; H2; Yin 2017** patrz **Załącznik 4**), szczepy zrekombinowane PVY^{N-Wi} i PVY^{NTN} były dominujące wśród izolatów infekujących rośliny ziemniaka w Polsce; również zostały znalezione w Polsce izolaty szczepów PVY^O, PVY^{NTN}, PVY^{N-Wi} oraz PVY^{Z-NTN} (**H1; H3**), jak również PVY^E (**Yin i in.**, nieopublikowane). W Polsce nie znaleziono wśród izolatów PVY zebranych z ziemniaka izolatów szczepu PVY^C.

Ogólnoświatowe rozprzestrzenienie się PVY^{NTN} i PVY^{N-Wi} zostało wyjaśnione przez ich selektywną przewagę nad szczepami rodzicielskimi (Kerlan, 2003/4). Szczepy zrekombinowane PVY^{N:O} (PVY^{N:O} jest również znany jako PVY^{N-Wi} wg. Singh i in. 2008) oraz PVY^{NTN} były przenoszone bardziej efektywnie przez *Myzus persicae* niż szczep PVY^O (Mondal i Gray, 2017). W Polsce stwierdzono, że transmisyjność izolatów PVY^{NTN} i PVY^{N-Wi} przez *M. persicae* była wyższa niż ta dla izolatów PVY^O oraz PVY^N (Kaliciak i Syller, 2009), zaś PVY^{NTN} był przenoszony bardziej efektywnie niż PVY^{N-Wi} (Kostiw i Trojanowska, 2011). W odmianach ziemniaka, w których występowała reakcja HR na PVY^O, przenoszenie wirusa przez mszyce było istotnie zredukowane (Carroll i in., 2016). Ponadto, PVY^{NTN} i PVY^{N-Wi} mogą często unikać wykrycia w trakcie wizualnej oceny w ramach certyfikowanej produkcji nasiennej z powodu słabych symptomów porażenia na roślinach ziemniaka (Kerlan, 2003/4). To jest ważne stwierdzenie dla polskich izolatów PVY^{N-Wi}, które wydają się być słabo skuteczne względem większości odmian i wywołują słabe objawy mozaiki, co powoduje znaczne utrudnienie w wykonaniu selekcji negatywnej w trakcie wegetacji roślin na pola nasiennych (Chrzanowska, 1994).

I.2 Charakteryzowanie trzech izolatów PVY z wykorzystaniem odmian indyktorowych ziemniaka, roślin testowych tytoniu oraz wykonanie sekwencjonowania całego genomu

Trzy izolaty PVY: PVY-3202, PVY-3303 i PVY-3411 zostały wybrane do oceny na odmianach indyktorowych ziemniaka (**H3**). Izolaty te nie indukowały nekrotycznej reakcji (HR) na inokulowanych liściach odmian ziemniaka King Edward, Désirée i Pentland Ivory. Wyjątek stanowił izolat PVY-3303, który indukował HR na liściach inokulowanych oraz dodatkowo na nieinokulowanych liściach powyżej liści inokulowanych odmiany Pentland Ivory, wywołując systemiczną odporność w oparciu o nadwrażliwość (*systemic hypersensitive resistance*, SHR). Badane trzy izolaty powodowały silne mozaiki i deformacje liści w odm.

King Edward, łagodne mozaiki w odm. Désirée oraz silne mozaiki w odm. Pentland Ivory w nieinokulowanych, wyższych liściach. Testem ELISA potwierdzono infekcję systemiczną trzech odmian izolatami PVY-3202, PVY-3303 i PVY-3411, wskazującą na przełamanie genów odporności *Ny*, *Nc* i *Nz*.

Tytoń (*Nicotiana tabacum* L.) jest powszechnie stosowaną rośliną testową w diagnostyce wirusów i jest rośliną gospodarzem dla PVY. Badane trzy izolaty były testowane na tytoniu odm. Samsun. Izolaty PVY-3202, PVY-3411 i PVY-3303 powodowały na tytoniu odpowiednio, silne VN (nekrozy nerwów), łagodne VN, i łagodniejsze VCI (rozjaśnienie nerwów) (tj. brak VN) (**H3; H4**).

Badania multipleksowym RT-PCR izolatów PVY-3202, PVY-3303 i PVY-3411 zaklasyfikowało je do PVY^{NTN} (typ B), PVY^{NTN} (typ A) and PVY^{N-Wi} (typ B), odpowiednio. (Lorenzen i in., 2006; Chikh-Ali i in., 2010) (**H3**).

Trzy izolaty PVY-3202, PVY-3303 i PVY-3411 zostały zsekwencjonowane (**H3**). Drzewo filogenetyczne całego genomu składające się z trzech wymienionych izolatów i dodatkowo 68 izolatów wybranych z bazy NCBI GenBank sugeruje, że PVY-3202, PVY-3303 oraz PVY-3411 wystąpiły w skupieniach wraz z izolatami, odpowiednio: PVY^{NTN} (typ B), PVY^{NTN} (typ A) oraz PVY^{N:O}/PVY^{N-Wi}. Numery akcesyjne w NCBI GenBank dla izolatów PVY-3202, PVY-3303 oraz PVY-3411 są następujące KX356068, KX356069 i KX356070, odpowiednio.

Podsumowując, klasyfikowanie szczepów trzech charakteryzowanych izolatów opierało się o ich cechy biologiczne i sekwencję genomu. Izolaty PVY-3202 oraz PVY-3411, które przełamały odporność HR warunkowaną genami *Ny*, *Nc* i *Nz* występującymi w odmianach indykatorowych oraz indukowały VN w tytoniu, zostały sklasyfikowane jako szczep PVY^N według Singh i in. (2008). Multipleksowy RT-PCR i sekwencjonowanie całego genomu tych izolatów pozwolił na sklasyfikowanie PVY-3202 i PVY-3411 jako szczepów zrekombinowanych PVY^{NTN} odpowiednio: (PVY^{NTN} typ B) oraz PVY^{N-Wi} (PVY^{N-Wi} typ B). Zarówno PVY^{NTN} jak i PVY^{N-Wi} są wariantami szczepu PVY^N (Singh i in., 2008). Izolat PVY-3303 wyraźnie wywoływał HR w odm. Pentland Ivory posiadającej gen *Nz* (aczkolwiek odporność ta nie była na tyle silna aby zlokalizować wirusa w miejscu infekcji) oraz nie indukował VN a wywoływał jedynie VCI na tytoniu. Dlatego PVY-3303 jest zaliczony do szczepu PVY^Z wg. Singh i in., (2008). Dodatkowo, izolat PVY-3303 indukował objawy PTNRD w bulwach odm. Etola, co spowodowało, że został następnie sklasyfikowany jako szczep PVY^Z-NTN. Ponadto, multipleksowy RT-PCR oraz sekwencja całego genomu potwierdziły, że na poziomie RNA PVY-3303 jest klasyfikowany jako szczep PVY^{NTN} (PVY^{NTN} typ A).

1.3 Porównanie HC-Pro w trzech izolatach PVY

Pomocniczy komponent proteinyzy (*Helper component proteinase*, HC-Pro) z rodziny *Potyviriidae*, w tym również w szczepach PVY, jest niezbędnym i wielofunkcyjnym białkiem, zaangażowanym w infekcję wirusową (przenoszenie się z rośliny na roślinę, ruch wirusów na duże odległości i rozwój objawów choroby u gospodarza) oraz, m. in., w reakcje obronne roślin oraz tłumienie wyciszania RNA (Valli i in., 2018).

Dlatego porównaliśmy sekwencję aminokwasów (aa) i przewidywaną trójwymiarową (*three-dimensional*, 3D) strukturę HC-Pro z trzech izolatów PVY: PVY-3202, PVY-3303 i

PVY-3411 (**H4**). Numeracja aminokwasów PVY HC-Pro jest oparta na miejscu cięcia P1/HC-Pro wyznaczonym przez porównanie dużej liczby genomów potywirusów (Adams i in., 2005). Jest to dziewięć reszt w dół od pierwszej pozycji aminokwasu, użytej do numeracji reszt aminokwasowych określonych przez Tribodet i in. (2005) i Hu i in. (2009) i jest porównywalna z numeracją stosowaną przez Tian i Valkonena (2013).

Pięć reszt aa różniło się pomiędzy HC-Pro w trzech izolatach (**H4**) następująco:

- (1) H₇₃ jest obecny we wszystkich trzech izolatach, jednak H₇₃ w PVY-3303 jest kodowany przez kodon CAY (nt 1228-1230, Y = C + T) i zarówno CAC jak i CAT kodują resztę H. H₇₃ w PVY-3303 reprezentuje przykład synonimicznych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (*single nucleotide polymorphism*, SNP). W tym przypadku na poziomie RNA wystąpiła zmiana pojedynczego nukleotydu tylko w niektórych cząsteczkach RNA, co spowodowało powstanie dwóch typów cząsteczek RNA. Dwa nukleotydy, tj. C lub T, w pozycji nt 1230, nie powodowały zmian kodowanych aminokwasów na poziomie białka. Ostatecznie te dwa typy cząsteczek RNA uległy translacji dając to samo białko.
- (2) Innym przykładem synonimicznych SNP jest S₄₃₄ w szczepie PVY-3411.
- (3) Miejsce X₂₅₂ w PVY-3303 jest reprezentowane przez dwa aminokwasy I₂₅₂ i V₂₅₂, które różni się od I₂₅₂ w szczepach PVY-3202 i PVY-3411. X₂₅₂ (I₂₅₂ i V₂₅₂) w pozycji 252 jest kodowany przez kodon RTT (nt 1765 -1767, R = A + G), a kody genetyczne ATT i GTT kodują odpowiednio aminokwasy I i V. I₂₅₂V reprezentuje przykład polimorfizmu pojedynczego aminokwasu (*single amino acid polymorphism*, SAP), znanych także jako niesynonimiczne polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (*non-synonymous single nucleotide polymorphism*, nsSNP) (Huang i in., 2012). W takim przypadku, na poziomie RNA, zmiana pojedynczego nukleotydu występuje tylko w niektórych cząsteczkach RNA, w wyniku czego powstają dwa typy cząsteczek RNA. Dwa nukleotydy, tj. A i G, które występują w pozycji nt 1765, rzeczywiście powodują zmiany w kodowanych aa i dają dwa różne aminokwasy. Podsumowując, te dwa typy RNA uległy translacji i powstają z nich dwa typy białek. Z tych dwóch reszt aminokwasowych aa, występowanie I₂₅₂ jest specyficzne dla szczepu PVY^N, który przełamuje gen HR ziemniaka *Ny* rozpoznający szczepy PVY^O, podczas gdy V₂₅₂ jest specyficznym zapisem dla PVY^O, który indukuje gen HR *Ny* w ziemniaku (Tian i Valkonen, 2013).
- (4) R₄₁₂ w PVY-3303 różni się od Q₄₁₂ w PVY-3202 i PVY-3411. Pojedyncza zmiana nukleotydu (A₂₂₄₂ na G₂₂₄₆) powoduje pojedynczą zmianę w aa (Q₄₁₂ na R₄₁₂).
- (5) N₂₆₃ w PVY-3411 różni się od K₂₆₃ w PVY-3202 i PVY-3303. Pojedyncza zmiana nukleotydów (G₁₇₉₆ na T₁₇₉₆) spowodowała pojedynczą zmianę w sekwencji aminokwasów (K₂₆₃ na N₂₆₃).

Niektóre inne konserwatywne motywy były obecne w HC-Pro we wszystkich trzech izolatach (**H4**), w tym:

- Sześć podobnych do PVY^N reszt aminokwasowych potrzebnych do indukcji VN w tytoniu (Tribodet i in., 2005; Faurez i in., 2012; Tian i Valkonen 2015)
- Motyw FRNK (aa 179-182), prawdopodobny punkt kontaktu z małymi interferującymi RNA (*small interfering RNA*, siRNA) i dupleks miRNA (Shibolet i in., 2007)
- Motywy RNA wiążące RNP-2 (IGN) (aa 246-251), RNP-1 (aa 282-289) i motyw CCCT (aa 290-293) związane z długodystansowym przemieszczaniem wirusa (Cronin i in., 1995; Maia i in., 1996; Urcuqui-Inchima i in., 2000)

- Osiem specyficznych dla PVY^N aminokwasów, które przełamują odporność HR ziemniaka *Nytr* rozpoznający szczepy PVY^O (Tian i Valkonen, 2013), z wyjątkiem SAP I₂₅₂V w PVY-3303.

Modelowanie struktury 3D HC-Pro w trzech izolatach przeprowadzono za pomocą serwera WWW I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (**H4**).

Pięć reszt aminokwasowych, które różnią się pomiędzy HC-Pro w trzech izolatach, tj. SNP H₇₃, SAP I₂₅₂V, substytucje R₄₁₂Q, N₂₆₃K i SNP S₄₃₄, nie powodowały zmian w strukturze 3D badanych białek (**H4**). W przypadku PVY-3303 HC-Pro analizowano dwa warianty, HC-Pro I₂₅₂ i HC-Pro V₂₅₂. Przewidywana struktura 3D PVY-3303 HC-Pro I₂₅₂ i HC-Pro V₂₅₂ była taka sama.

Zachowane motywy RNP-1, CCCT i IGN w RNP-2 (LAIGNL) znajdowały się w tej samej strukturze białka HC-Pro w badanych szczepach PVY-3202, PVY-3303 i PVY-3411.

Różnice w strukturze 3D wykryto tylko w HC-Pro w izolacie PVY-3411 (**H4**). W przypadku PVY-3411 HC-Pro, aminokwas M₁₇, był w strukturze zwiniętej, L₂₃₈ w sekwencji łańcucha i T₂₄₃ w strukturze zwiniętej; natomiast te dla PVY-3202 i PVY-3303 znajdują się odpowiednio w strukturach helisy, zwiniętej, i łańcuch.

Podsumowując, **izolat PVY^Z-NTN o nazwie PVY-3303 zidentyfikowany w naszych analizach jest pierwszym opisanym tego typu w Europie (H3)** i w prezentowanej pracy wykazano możliwość istnienia nowych elementów genetycznych związanych z utratą VN w tytoniu (**H4**). Wcześniej został scharakteryzowany izolat PVY^Z-NTN o nazwie L26 infekujący ziemniaki w USA (Hu i in., 2009; Kerlan i in., 2011). Wielokrotne dopasowanie sekwencji całego genomu L26 z innymi izolatami PVY^{NTN}, które powodują VN w tytoniu, sugerowało, że pojedyncza zmiana (D₁₉₆ na G₁₉₆) w białku HC-Pro w izolacie L26 koreluje z utratą VN w tytoniu (Hu i in., 2009). Jednak w HC-Pro w szczepie PVY-3303, który został przez nas zidentyfikowany (**H4**) obecny jest aminokwas D₁₉₆, co wskazuje, że genetyczna determinacja VN i PVY w tytoniu jest złożona i może obejmować również inne elementy (zidentyfikowane możliwe inne elementy są opisane szczegółowo w punkt 4c **III.8** autoreferatu "*Możliwy udział białka HC-Pro PVY w rozwoju objawów i odpowiedzi obronnej*").

Ponadto, zgodnie z moją wiedzą, mimo iż SNP były stosowane jako markery do genotypowania i rozróżniania szczepów PVY (PVY^O, PVY^N, PVY^{NTN} i PVY^{N-Wi}) (Jacqot i in., 2005; Rolland i in., 2008; Rupar i in., 2013), zróżnicowanie typu SAP znalezione w pojedynczym izolacie nie zostały wcześniej opublikowane. Quasi gatunkowa natura wirusów RNA jest dobrze znana i odnosi się do faktu, że pojedynczy izolat wirusa nie zawiera tej samej sekwencji nukleotydowej, ale składa się ze z różnych mutantów (Domingo i in., 2012).

1.4 Podsumowanie badań szczepów PVY

1. PVY^{N-Wi} (od 1984 r.) i PVY^{NTN} (od 1994 r.) były głównymi szczepami zakażającymi ziemniaki jadalne w Polsce. (**H1; H2**)
2. Całe genomy trzech izolatów reprezentujących PVY^{NTN}, PVY^{N-Wi} i PVY^{Z-NTN} zostały zsekwencjonowane. (**H3**)
3. Unikalny szczep PVY^{Z-NTN} jest pierwszym tego typu gatunkiem opisanym w Europie. (**H3**)

4. Mutacje np. SNP, SAP, substytucje aminokwasów i różnice w przewidywanej strukturze 3D, znaleziono w supresorze wyciszania RNA (*RNA silencing suppressor*, RSS) PVY HC-Pro w trzech zsekwencjonowanych izolatach w **H3**. (**H4**)
5. Znaleziono domniemane, nowe elementy genetyczne w HC-Pro, które mogą być związane z VN w tytoniu. (**H4**)

II. Badania gospodarza – ziemniaka i tytoniu

II.1 Ocena odporności odmian ziemniaka oraz ich reakcji na izolaty PVY

Oceniono odporność i reakcję na PVY 113 odmian ziemniaka z grupy 133 odmian zarejestrowanych w Polsce w 2009 roku (**H2**). Dla grupy 113 odmian poziom odporności na PVY był oceniony w testach polowych, w skali 1-9, gdzie 1 znaczy podatny a 9 skrajnie (ekstremalnie) odporny. Ponadto, oceniano reakcję odpornościową tych odmian na cztery izolaty PVY w warunkach szklarniowych po mechanicznej inokulacji. Zastosowano do inokulacji następujące izolaty: izolat LW (szczep PVY^O wprowadzony do kolekcji w 1970r., numer akcesyjny w NCBI GenBank AJ890349), izolat Ny (szczep PVY^N pochodzący z 1974r., numer akcesyjny FJ666337), izolat Wi (szczep PVY^{N-Wi} wprowadzony do kolekcji w 1984r., EF558545) oraz izolat 12/94 (szczep PVY^{NTN} pochodzący z 1994 r., AJ889866). Badane odmiany zostały sklasyfikowane na podstawie procentu porażonych roślin, objawów porażenia i wyników testu ELISA na 5 klas: (1) ER; (2) HR; (3) stosunkowo odporne (R); (4) umiarkowanie odporne (mR); (5) podatne (S). Wśród 113 ocenianych odmian, 45 odmian było odporne na wszystkie cztery izolaty (tj., 23 ER, 11 HR i 11 R lub mR) a 24 odmiany były podatne na wszystkie izolaty. Ponadto, 44 odmiany były odporne (R lub mR) na pewne izolaty a podatne na inne izolaty. Odmiany o zróżnicowanej podatności na izolaty PVY, w większości były bardziej podatne na izolaty Wi oraz 12/94, niż na starsze izolaty LW i Ny.

II.2 Szczepowo-specyficzna odporność na PVY typu HR w odmianie Etola

Polska odmiana ziemniaka Etola zarejestrowana w 2009 roku, miała ocenę odporności na PVY wynoszącą 5-6 stopnia w skali 9 stopniowej, gdzie 9 znaczy ER. W trakcie kilku lat prowadzonej przez nas oceny odporności tej odmiany w warunkach szklarniowych, odm. Etola wykazała HR na izolat PVY^{NTN}, natomiast była tylko częściowo odporna lub podatna na kilka innych izolatów. Dlatego zbadaliśmy w tej odmianie typy reakcji na trzy ostatnio zsekwencjonowane przez nas izolaty tj. PVY-3411 (PVY^{N-Wi}), PVY-3303 (PVY^{Z-NTN}) oraz PVY-3202 (PVY^{NTN}) (**H3**).

Odmiana Etola wykazała reakcję HR na izolat PVY-3202 (PVY^{NTN}) (**H3**). Ten izolat powodował HR, tj. reakcje nekrotyczne w inokulowanych liściach. Jednak w górnych, nieinokulowanych liściach nie wystąpiły objawy infekcji i nie stwierdzono obecności wirusa w oparciu o wyniki testu ELISA. Ponadto, nie stwierdzono akumulacji wirusowego *HC-Pro* RNA w nieinokulowanych górnych liściach, co dodatkowo potwierdziło brak systemicznego namnażania wirusa w roślinach odm. Etola inokulowanych PVY-3202.

Odmiana Etola wykazuje różny poziom częściowej odporności HR na izolaty PVY^{N-Wi} oraz PVY^{Z-NTN} (**H3**). Izolat PVY-3411 (PVY^{N-Wi}) oraz izolat PVY-3303 (PVY^{Z-NTN}) powodowały HR i/lub VN w liściach inokulowanych, ale w mniejszym stopniu niż to powodował izolat PVY-3202. Jednak odporność odm. Etola nie była na tyle wysoka, aby

wystąpiła lokalizacja wirusa w miejscach inokulacji. Wirus przeniósł się do nieinokulowanych górnych liści powodując systemiczną odporność w oparciu o nadwrażliwość (SHR), nekrotyczne reakcje w tych liściach oraz wystąpienie objawów, takich jak silna SHR, silna mozaika i silna nekrotyzacja nerwów VN powodowana przez PVY-3411, łagodna SHR i łagodne VN powodowane przez PVY-3303 (**H3**). Izolat PVY-3411 rozprzestrzenia się i akumuluje szybciej wykazując relatywnie więcej białka płaszczka (*coat protein*, CP) wirusa oraz więcej *HC-Pro* RNA niż izolat PVY-3303.

Do dziś zostało zidentyfikowane szereg genów odporności HR (*N*): *Ny_{ibr}* na szczep PVY^O, *Nc_{ibr}* oraz *Nc_{spl}* na szczep PVY^C, *Nz_{ibr}* na szczep PVY^Z oraz *Nd* na nowo zdefiniowany szczep PVY^D (Singh i in., 2008; Moury i in., 2011; Tian i Valkonen, 2013; Chikh-Ali i in., 2014; Kehoe i Jones, 2016). Rowley i in. (2015) zaproponowali obecność trzech nowych domniemanych genów HR (*N*), tj. *Nw* warunkującego odporność na PVY^{N-Wi}, *Nne* warunkującego odporność na PVY-NE11 oraz genu *Ne* odporności na PVY^E, które mogą warunkować odporność na wiele szczepów PVY w odmianie Yukon Gem z USA.

W badaniu odm. **Etola reprezentuje nowe, szczepowo-specyficzne źródło oporności przeciwko trzem szczepom PVY (H3)**. W konkluzji stwierdzamy, że odm. Etola posiada gen *Nz*, który jest uruchamiany przez nowozidentyfikowany szczep PVY^Z-NTN (izolat PVY-3303) i zapewnia całkowitą odporność na zrekombinowany **szczep PVY^{NTN} oraz różny poziom odporności częściowej na zrekombinowane szczepy PVY^Z-NTN i PVY^{N-Wi}**.

II.3 Podsumowanie badań odmian ziemniaka i tytoniu jako gospodarzy PVY

1. Odmiany ziemniaka różnią się w reakcji odpornościowej na PVY. (**H2**)
2. Odmiana ziemniaka Etola, opisana w omówionych badaniach, reprezentuje nowe źródło odporności na PVY dostępne w ziemniaku (**H3**)
3. Odm. Etola posiada między innymi gen *Nz*, który warunkuje HR przeciwko wielu szczepom (**H3**):
 - HR na PVY^{NTN}, brak objawów
 - Częściowa HR na PVY^{N-Wi}, silne objawy
 - Częściowa HR na PVY^Z-NTN, słabe objawy
4. Tytoń odm. Samsun wykazuje szczepowo-specyficzne objawy po infekcji różnymi szczepami PVY (**H4**) (patrz 4.c **I.2** autoreferatu):
 - Silne VN na PVY^{NTN}
 - Łagodne VN na PVY^{N-Wi}
 - Łagodniejsze VCI na PVY^Z-NTN.

III. Badanie interakcji gospodarz – wirus Y ziemniaka, PVY

III.1 Interakcja gospodarz – wirus Y ziemniaka z uwzględnieniem roli cząsteczek miRNA - hipoteza

Nasze odkrycia sugerują, że ten sam gospodarz może wykazywać różne reakcje na poszczególne szczepy PVY. Dlatego dalsze badania koncentrują się na swoistej interakcji szczepów PVY-gospodarza, oraz roli cząsteczek miRNA. Hipoteza jest taka, że u gospodarza o takim samym podłożu genetycznym, różne szczepy PVY mogą powodować zmiany w badanych aspektach molekularnych, np. ekspresji miRNA; która mogłaby ulegać zmianom w zależności od porażenia specyficznym szczepem.

Do badań użyto dwóch gospodarzy, tj. ziemniaka odm. Etola wykazującej odporność w oparciu o nadwrażliwość specyficzną względem szczepu i tytoniu odm. Samsun wykazującej objawy swoiste dla szczepu PVY. Wykorzystano trzy szczepy PVY, tj. szczep PVY^{NTN} reprezentowany przez izolat PVY-3202, szczep PVY^{N-Wi} reprezentowany przez izolat PVY-3411 i szczep PVY^{Z-NTN} reprezentowany przez izolat PVY-3303. Przeanalizowaliśmy grupę cząsteczek miRNA, które są powiązane z odpowiedzią na stres: 10 miRNA i 14 mRNA w interakcjach PVY-ziemniak, 26 miRNA i 23 mRNA w interakcji PVY-tytoń.

III.2 Specyficzna dla szczepu zmiana miRNA i ich cząsteczek docelowych w inokulowanym PVY ziemniaku odmiany Etola

W interakcji PVY-ziemniak, zbadane cząsteczki miRNA i cząsteczki docelowe wykazały specyficzną dla szczepu zmianę poziomu ekspresji w odpowiedzi typu HR i częściową reakcję HR i były powiązane z nasileniem objawów (patrz punkt 4.c **III.7**) i poziomem RNA *HC-Pro* (patrz punkt 4.c **III.6** autoreferatu) (**H3**; Tabela 1).

W nieinokulowanych górnych liściach, ekspresja zbadanych cząsteczek miRNA i ich cząsteczek docelowych mRNA uległa zmianie w roślinach odm. Etola zakażonych izolatami PVY-3411 (PVY^{N-Wi}), który spowodował silne objawy występujące na liściach (**H3**). Jednak w roślinach zakażonych izolatami PVY-3303 (PVY^{Z-NTN}), które wykazywały łagodne objawy oraz w tych inokulowanych izolatami PVY-3202 (PVY^{NTN}), które nie podlegały infekcji (brak objawów), poziom ekspresji tego samego zestawu miRNA i cząsteczek docelowych mRNA pozostał niezmienny. W roślinach zakażonych wirusem PVY-3411 wzrost ekspresji stu-miR162, stu-miR168a i miR172e, wraz ze wzrostem ekspresji ich cząsteczek docelowych, tj., odpowiednio, *AGO1-2*, *DCL1* i *TOE3*, korelował z wysoką zawartością *HC-Pro* RNA kodującego RSS, a to z kolei może być skorelowane z silnymi objawami porażenia występującymi na liściach roślin porażonych. Ponadto, porażenie izolatami PVY-3411 powodowało również wzrost ekspresji cząsteczek: stu-miR482 i ich docelowych mRNA *Gpa2* i *CC-NBS-LRR*, które biorą udział w odpowiedzi obronnej (**H3**).

Pełny opis nazw genów *AGO1-2*, *DCL1*, *TOE3*, *Gpa2* i *CC-NBS-LRR* znajduje się w sekcji "Skróty"

Niedawno Križnik i in. (2017) badali rolę małych RNA, w tym miRNA w reakcji tolerancji ziemniaka odm. Désirée na zakażenie szczepem PVY^{NTN} w inokulowanych liściach, 3 dpi, zanim wirus zostanie wykryty. Wykazano zahamowanie przekazu sygnałnego giberelin przez miR167, regulację transkryptów receptorów immunologicznych przez miR6022, jak również wzrost ekspresji cząsteczek miR164, miR167, miR169, miR171, miR319, miR390 i miR393 w reakcji tolerancji odm. Désirée (Križnik i in., 2017). Jednak nasze badania dostarczyły **pierwszy przykład specyficznej dla szczepu modyfikacji zestawu miRNA gospodarza i ich cząsteczek docelowych w interakcji odpornościowej ziemniak-PVY (H3)**.

Tabela 1

Cząsteczki miRNA oraz ich sekwencje mRNA docelowe, które wykazały zmiany ekspresji w roślinach gospodarza podczas interakcji PVY-ziemniak i PVY-tytoń (**H3**; **H4**)

Gospodarz	PVY szczep ^a	Silny lub łagodny szczep dla danego gospodarza	Odpowiedź obronna gospodarza	Objawy na gospodarzu	HC-Pro RNA poziom (REL)	miRNAs / zmiana targetu	
						Liczba genów	Zmiana ekspresji
Ziemniak odm. Etola	PVY ^{NTN}	Brak infekcji	HR	brak	0	0	nc
	PVY ^{N-Wi}	Silny szczep	częściowa HR	silne SHR silna mozaika silna VN	5.18	13	↑1.4-5.7
	PVY ^{Z-NTN}	Łagodny szczep	częściowa HR	łagodna SHR łagodna VN	0.13	1	↑3.0
Tytoń odm. Samsun	PVY ^{NTN}	Silny szczep	nieefektywna HR	silna VN	85	31	↑ 1.4-38 (76 ^b) ↓ 0.09-0.6
	PVY ^{N-Wi}	Silny szczep	nieefektywna HR	Łagodna VN	94	29	↑ 1.5-24 (71 ^b) ↓ 0.18-0.7
	PVY ^{Z-NTN}	Łagodny szczep	nieznany	utrata VN (łagodna VCl)	40	9	↑ 1.7-3.4 (39 ^b) ↓ 0.3-0.7

^aPVY^{NTN}, PVY^{N-Wi} i PVY^{Z-NTN} szczepy pochodziły z izolatów PVY-3202, PVY-3411 i PVY-3303.

^bNajwyższa indukcja ekspresji miRNA, miR482.

Zmiana ekspresji: krotność zmiany relatywnej ekspresji w infekowanych roślinach wirusem PVY w korelacji z roślinami nie inokulowanymi wirusem, lecz kontrolą z wodą (*Mock-inoculated*)

HR: (*hypersensitive resistance*) odporność w oparciu o reakcję HR, np. nekroza na inokulowanych liściach

REL (*Relative expression level*): relatywny poziom ekspresji genu, po normalizacji z genem referencyjnym

SHR: systemowa HR, nekroza w nieinokulowanych górnych liściach

VCl: rozjaśnienie nerwów

VN: nekrozy nerwów.

↑: wzrost ekspresji

↓: spadek ekspresji

III.3 Zależne od szczepu zmiany ekspresji cząsteczek miRNA i ich cząsteczek docelowych w roślinach tytoniu cv. Samsun zakażonych PVY

W artykule **H4** dostarczono pierwszych informacji na temat wpływu różnych szczepów PVY na równowagę cząsteczek miRNA w tytoniu odmiany odm. Samsun (**H4**). Obserwowana specyfika zmian miRNA i cząsteczek docelowych, w zależności od szczepów wirusa, korespondowała z nasileniem objawów na roślinie (patrz punkt 4.c **III.7**) i poziomami ekspresji wirusowego HC-Pro RNA (patrz punkt 4.c **III.6** autoreferatu) (**H4**; Tabela 1).

W interakcji PVY-tytoń szczepy PVY^{NTN} (PVY-3202) i PVY^{N-Wi} (PVY-3411) powodowały odpowiednio: silną i łagodną VN w górnych nieinokulowanych liściach tytoniu, podczas gdy szczep PVY^{Z-NTN} (PVY-3303) indukował łagodniejszą odpowiedź VCl (**H4**). Obecność 18 z 26 badanych miRNA wzrosła po infekcji przez silne szczepy PVY^{NTN} i PVY^{N-Wi}. Ekspresja grupy transkryptów związanych z reakcją obronną wzrosła, natomiast spadła tych cząsteczek mRNA, które wykazały powiązania z regulacją transkrypcji, fosforylacją białek i różnicowaniem komórek (**H4**). Inokulacja łagodnym szczepem PVY^{Z-NTN} spowodowała wzrost ekspresji tylko trzech przetestowanych miRNA. Testowany zestaw cząsteczek miRNA i ich cząsteczek docelowych, ulegał zmianom ekspresji po inokulacji szczepami PVY^{NTN} i PVY^{N-Wi} lub przez wszystkie trzy szczepy, ale najsilniejszy szczep PVY^{NTN} powodował również największe zmiany w poziomach ekspresji w porównaniu do silnego szczepu PVY^{N-Wi} i łagodnego PVY^{Z-NTN}.

Roślinne miRNA poprzez komplementarność, dokładnie lub prawie dokładnie wychwytyją swoje cząsteczki docelowe mRNA doprowadzając do ich trawienia i degradacji (Bartel, 2004). Tak więc, miRNA i ich targety zasadniczo wykazują wzajemnie antagonistyczne poziomy ekspresji w roślinach zakażonych wirusami (Naqvi i in., 2010). Jednak równoległy wzrost ekspresji docelowych mRNA i odpowiadających im cząsteczek miRNA, był często obserwowany w roślinach zakażonych wirusem, ale w późniejszym etapie infekcji. Również w późniejszym etapie infekcji, białka wirusowe, np. RSS, mogą wpływać hamująco na aktywność miRNA. Na przykład, potywirus P1/HC-Pro, RSS, który ulegał ekspresji w transgenicznym roślinaх *Arabidopsis*, wyraźnie hamował zmiany w przekształceniu miRNA*, co sugeruje hamowanie odwijanie miRNA / miRNA* i tłumienie zespołu kompleksu wyciszającego RNA (RISC) (Chapman i in., 2004). Wirus mozaiki rzepy (*Turnip mosaic virus*, TuMV) i kodowane przez niego RSS P1/HC-Pro u *Arabidopsis* zakłócały aktywność miR171, który kieruje ciecieniem i degradacją kilku mRNA kodujących czynniki transkrypcyjne typu Scarecrow, hamując ich funkcję nukleolityczną (Kasschau i in., 2003).

Zestaw cząsteczek miRNA ulegających zmianie po infekcji tytoniu wirusem PVY, zidentyfikowanych w tej pracy, zalicza się do tych miRNA, które uważane są za biorące udział w odpowiedzi na stresi biotyczne i abiotyczne, np. u tytoniu zakażonego wirusem mozaiki tytoniu (*Tobacco mosaic virus*, TMV) (Bazzini i in., 2011; Khraiweh i in., 2012). Uzyskane przeze mnie dane (**H4**) potwierdzają wzrost ekspresji cząsteczek nta-miR159, nta-miR319 i nta-miR166 w roślinach tytoniu infekowanych PVY^N (Guo i in., 2017).

W prezentowanej pracy (**H4**) zaobserwowano wzmożoną ekspresję cząsteczek nta-miR172, nta-miR390, nta-miR6025 i nta-miR6164 w roślinach tytoniu infekowanych PVY^{NTN} i PVY^{N-Wi}, a ekspresja tych samych cząsteczek miRNA ulegała zmniejszonej ekspresji w tytoniu po infekcji wirusem PVY^N, jak wykazał to Guo i in. (2017), Może to wskazywać na specyficzny wpływ szczepu na ekspresję konkretnych miRNA gospodarza. Podobnie, ekspresja cząsteczki nta-miR396b była zwiększona, a nta-miR164 była obniżona w tytoniu zakażonym PVY^N (Guo i in., 2017), natomiast poziomy ekspresji pozostały niezmiennie w naszych badaniach u tytoniu zakażonego PVY^{NTN}, PVY^{N-Wi} lub PVY^{Z-NTN} (**H4**).

III.4 Zależna od gospodarza, specyficzna dla szczepu PVY zmiana ekspresji miRNA

Kolejne prace dostarczyły dodatkowych dowodów na to, że specyficzna dla szczepu wirusa zmiana ekspresji miRNA zależy również od gospodarza (**H3; H4**).

Ten sam szczep PVY, który u jednego gospodarza spowodował poważne objawy i zmiany w poziomach ekspresji miRNA, w innym gospodarzu nie wywoływał objawów ani zmienionej ekspresji miRNA, np. u tytoniu zakażonego PVY^{NTN} wystąpiła nieefektywna HR, silne VN i zmiana w poziomie ekspresji miRNA. Natomiast w ziemniaku inokulowanym szczepem PVY^{NTN} odmiany Etola wykazano pełne HR, brak objawów i brak zmienionej ekspresji miRNA (**H3; H4; Tabela 1**).

Z drugiej strony, różne lub też te same szczepy, powodujące silne objawy u różnych gospodarzy, mogą prowadzić do zmian miRNA co zaobserwowano, np. w ziemniaku odmiany Etola zakażonym PVY^{N-Wi}, wykryto częściową HR z silną mozaiką, silną reakcją VN i silną SHR oraz np. w tytoniu zakażonym PVY^{NTN} lub PVY^{N-Wi} wykazującym nieefektywną HR z silną reakcją VN (**H3; H4; Tabela 1**).

III.5 Specyficzna dla szczepu PVY zmiana poziomu ekspresji miRNA gospodarza jest związana z odpowiedzią obronną

W interakcji PVY-Etola, w roślinach ziemniaka zarażonych wirusem PVY^{N-Wi} występują zmienione, swoiste dla szczepu cząsteczki miRNA i jest to skorelowane z częściowym HR i silnymi objawami (**H3**).

W interakcji PVY-tytoń w tytoniu porażonym PVY^{NTN} i PVY^{N-Wi}, występują zmiany cząsteczek miRNA, zależne od szczepu wywołującego nekrozy nerwów VN (**H4**).

Ostatnie odkrycia Michel i in. (2018) sugerują, że w tytoniu indukowana przez wirus PVY^N odpowiedź VN prawdopodobnie jest skorelowana z nieefektywną odpowiedzią obronną i cechami podobnymi do HR.

W oparciu o dane uzyskane w pracach **H3** i **H4**, można wnioskować, że specyficzna względem szczepu, zmiana poziomu ekspresji badanych miRNA gospodarza zarówno w oddziaływaniu PVY-ziemniaka, jak i PVY-tytoniu pociąga za sobą odpowiedź HR.

III.6 Specyficzna dla szczepu PVY zmiana poziomu ekspresji miRNA i cząsteczek docelowych jest związana z poziomem PVY RSS HC-Pro

Specyficzna dla szczepu zmienność w poziomach ekspresji miRNA gospodarza była poprzednio obserwowana w roślinach pomidora i *Arabidopsis* zainfekowanych wirusem mozaiki ogórka (*Cucumber mosaic virus*, CMV) (Cillo i in., 2009; Du i in., 2014). Wykazano, że białko 2b, RSS pochodzące z silnego szczepu CMV-Fny, (z wykluczeniem łagodnych szczepów CMV-LS lub CMV-Q), blokowało aktywność Argonaute 1 (AGO1) i osłabiało prawidłowe cięcie cząsteczek mRNA kierowanego miRNA u *Arabidopsis* (Chapman i in., 2004; Zhang i in., 2006; Lewsey i in., 2007). Wielofunkcyjne białko HC-Pro potyvirusa jest RSS i może wpływać na rozwój roślin i funkcję miRNA (Kasschau i in., 2003).

W tym badaniu, w interakcji PVY-ziemniak, poziom *HC-Pro* RNA w silnym izolacie PVY-3411 (PVY^{N-Wi}) infekującym ziemniak odm. Etola był znacznie wyższy (40-krotnie) niż w łagodnym izolacie PVY-3303 (PVY^{Z-NTN}). Nie wykryto RNA *HC-Pro* w szczepie PVY-3202 (PVY^{NTN}) po inokulacji odm. Etola, która wykazuje odporność na PVY-3202 (**H3**). W interakcji PVY-tytoń wyższe poziomy RNA *HC-Pro* PVY wykryto w silnych izolatach PVY-3202 i PVY-3411 infekowanych roślin tytoniu, a niższe poziomy RNA w łagodnym szczepie PVY-3303 (**H4**).

Zaobserwowano większą zmianę cząsteczek miRNA i cząsteczek targetowych u obu gospodarzy: w ziemniaku zakażonym PVY^{N-Wi} oraz w tytoniu zakażonym PVY^{NTN} lub PVY^{N-Wi}, co było skorelowane z wyższym poziomem akumulacji *HC-Pro* RNA, w porównaniu do tych w roślinach ziemniaka i tytoniu infekowanych PVY^{Z-NTN}, które wykazywały niższe poziomy *HC-Pro* RNA (**H3**; **H4**; Tabela 1).

III.7 Specyficzna dla szczepu PVY zmiana poziomu ekspresji miRNA jest związana z nasileniem objawów

Poprzednie badania wskazywały, że nasilenie objawów powodowanych przez wirusy DNA lub RNA jest skorelowane z akumulacją miRNA (Bazzini i in., 2007, Naqvi i in., 2010). miR159/319 i miR172 mogą być powiązane z chorobą kędzierzawości liści pomidora

spowodowaną zakażeniem wirusem kędzierzawości liści pomidora z New Delhi (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV) (Naqvi i in., 2010). Du i in. (2014) zasugerowali, że silny szczep CMV-Fny bezpośrednio przyczynia się do patogenności poprzez zakłócanie aktywności miR159, a poważne objawy choroby wynikają z deregulacji cząsteczek miR159 oraz cząsteczek docelowych: *MYB33* i *MYB65*.

W przedstawianej pracy, sugerujemy, że wybrane cząsteczki miRNA o zmienionych poziomach ekspresji w ziemniaku zakażonym PVY^{N-Wi} odm. Etola, np. stu-miR168a, stu-miR162 i stu-miR172e, mogą być związane z poważnymi objawami na liściach (**H3**).

Co więcej, nasze wyniki potwierdziły najnowsze odkrycia Michel i in. (2018), że indukowana przez PVY^N, VN w tytoniu jest prawdopodobnie niewydajną odpowiedzią typu HR i wymagany jest gen *NBS-LRR NtTPN1(R)* tytoniu i transdukcja sygnału. W tym badaniu, grupa cząsteczek miRNA związanych z odpowiedzią obronną oraz targetowych transkryptów była wyższa w roślinach tytoniu zakażonych silnymi szczepami PVY^{NTN} i PVY^{N-Wi} wykazującymi VN, a pozostała niezmienną w roślinach inokulowanych łagodnym szczepem wirusa PVY^{Z-NTN} wykazywała VCI (**H4**). Wśród nich, trzy targetowe transkrypty *TMV N* dla nta-miR6020a-5p i nta-miR6164a/b, należące do rodziny genów odporności *TIR-NBS-LRR* biorą udział w transdukcji sygnału, co stwierdzono na podstawie klasyfikacji ontologicznej (*Gene ontology*, GO) (**H4**). **W związku z tym można wnioskować, że zwiększona ekspresja nta-miR6020a-5p i nta-miR6164a/b może korelować z indukowaną reakcją VN na PVY^{NTN} i PVY^{N-Wi} w tytoniu (H4).**

Pełny opis genów *MYB33*, *MYB65*, *NtTPN1*, *TMV N* i *TIR-NBS-LRR* znajduje się w sekcji "Skróty" autoreferatu.

III.8 *Możliwy udział białka HC-Pro PVY w rozwoju objawów i odpowiedzi obronnej*

Wcześniejsze badania wykazały siedem pochodnych-PVY^N reszt aminokwasowych potrzebnych do indukcji VN w tytoniu, tj. N₃₃₀, K₃₉₁ i E₄₁₀ (Tribodet i in., 2005; Faurez i in., 2012), N₃₃₀, R₃₃₈, F₃₄₁ i I₃₄₆ (Tian i Valkonen, 2015). Wszystkie te aminokwasy są obecne w białku HC-Pro w analizowanych przeze mnie (**H4**) trzech izolatach, tj. PVY-3202 (PVY^{NTN}) (silna VN w tytoniu), PVY-3303 (PVY^{Z-NTN}) (łagodniejszy VCI w tytoniu) i PVY-3411 (PVY^{N-Wi}) (VN w tytoniu), wskazują na udział również innych elementów w wywoływaniu objawów PVY w tytoniu.

Porównując HC-Pro pomiędzy trzema izolatami, po raz pierwszy wykazano, że **dotatkowe elementy, tj. SAP I₂₅₂V i substytucja Q₄₁₂ na R₄₁₂ w białku HC-Pro w izolacie PVY^{Z-NTN} (PVY-3303) mogą być związane z utratą VN u tytoniu w porównaniu z PVY-3202 powodującym silne VN u tytoniu (H4)**. Różna struktura wtórna przewidziana dla M₁₇ (zwinięcie), L₂₃₈ (łańcuch) i T₂₄₃ (zwinięcie) i **podstawienia K₂₆₃ na N₂₆₃, w białku HC-Pro w izolacie PVY^{N-Wi} (PVY-3411) może być związana z łagodną VN (tj. o zmniejszonym nasileniu VN) w tytoniu w porównaniu do PVY-3202 powodującym silną VN (H4)**.

Osiem specyficznych dla PVY^N "sygnatur", tj. N₂₃₆, L₂₃₈, A₂₄₇, I₂₅₂, R₂₆₂, K₂₆₉, R₂₇₀ i V₃₀₁, które przelamują gen *Nyibr* odporności HR rozpoznającymi szczepy PVY^O (Tian i Valkonen, 2013) są obecne w sekwencji HC-Pro w trzech izolatach użytych w tym badaniu tj. PVY-3202, PVY-3303 i PVY-3411, za wyjątkiem SAP I₂₅₂V w PVY-3303.

W tej pracy, aminokwas V₂₅₂ specyficzny dla PVY^O, który indukuje gen *Ny* warunkujący odporność HR w ziemniaku, w pozycji I₂₅₂V (SAPs) w szczepie PVY^Z-NTN (PVY-3303) **może być związany z częściową HR i z łagodnymi objawami u ziemniaka odm. Etola (H3; H4)**. Dowiedziono, że pozycja L₂₃₈ **jest specyficzna dla szczepu PVY^N** i jest istotna w celu przełamania genu *Ny_{thr}* odporności HR w ziemniaku, poprzez inną strukturę nici w PVY^{N-Wi} szczepu (PVY-3411) co **może być związane z częściową HR i silnymi objawami w odm. Etola (H3; H4)**.

III.9 Podsumowanie badań interakcji PVY-gospodarz

1. Przedstawione prace dostarczają pierwszych przykładów, specyficznych dla szczepu, zmienności w zestawie cząsteczek miRNA ulegających ekspresji w roślinie gospodarza i ich cząsteczek docelowych w oddziaływaniu PVY-ziemniak i PVY-tytoń. **(H3; H4)**
2. W większość badanych miRNA ma zwiększoną ekspresję tylko u roślin zakażonych szczepami powodującymi silne objawy - **(H3; H4)**
 - w zakażonym PVY^{N-Wi} ziemniaku odm. Etola
 - w tytoniu zakażonym przez PVY^{NTN} i PVY^{N-Wi}
 - ale nie po infekcji gospodarza łagodnym szczepem PVY^Z-NTN
3. Zestaw genów targetowych skorelowanych z odpowiedzią obronną *NBS-LRR* (*R*) wykazuje zwiększenie ekspresji w obu badanych gospodarzach. **(H3; H4)**
4. Dwie cząsteczki miRNA, miR6020a-5p i miR6164a/b celujące w geny *TIR-NBS-LRR* *TMV N* (*R*), które to biorą udział w transdukcji sygnału, mogą korelować z indukowaną nekrozą nerwów VN w tytoniu powodowaną przez szczepy PVY^{NTN} i PVY^{N-Wi}. **(H4)**
5. SAP (I₂₅₂V, V₂₅₂) i substytucje Q₄₁₂ do R₄₁₂ w HC-Pro szczepu PVY^Z-NTN mogą być związane z utratą wywoływania VN w tytoniu. **(H4)**
6. Różna struktura 3D przewidziana dla M₁₇ (zwinienie), L₂₃₈ (łańcuch) i T₂₄₃ (zwinienie) i substytucja K₂₆₃ na N₂₆₃, w białku HC-Pro w szczepie PVY^{N-Wi} może być związana z łagodną nekrozą nerwów VN (tj. zmniejszeniem nasilenia VN) w tytoniu. **(H4)**
7. Pozycja aminokwasu V₂₅₂, jest specyficzna dla szczepu PVY^O indukującego gen *Ny* odporności HR w ziemniaku, natomiast SAP I₂₅₂V w HC-Pro szczepu PVY^Z-NTN może być związana z częściową odpornością HR i łagodnymi objawami u ziemniaka odm. Etola. **(H4; H3)**
8. Znalaziono dowody na to iż, specyficzna struktura dla PVY^N - L₂₃₈, w celu przełamania genu HR *Ny* w ziemniaku, znajduje się w strukturze nici w HC-Pro w szczepie PVY^{N-Wi} i może to odnosić się do częściowej HR z silnymi objawami w odm. Etola. **(H4; H3)**

III.10 Wnioski z badań miRNA

Cząsteczki miRNA i ich cząsteczki docelowe są:

- Specyficzne dla danego szczepu wirusa
- Zależne od gospodarza
- Związane z typem obrony
- Zależne od nasilenia objawów
- Powiązane z PVY RSS HC-Pro

Możliwości zastosowania badań nad wirusem PVY, gospodarzem i interakcją patogen-gospodarz

Przedstawione wyniki badań wirusologicznych i molekularnych mają zarówno charakter podstawowy, jak i aplikacyjny.

1. Zidentyfikowane nowe źródło odporności na PVY w ziemniaku, tj. gen *Nz* w odm. Etola, który jest ważny dla hodowli i produkcji ziemniaków, zapewniając odporność na wiele szczepów tego wirusa.
2. Zidentyfikowane wrażliwe na PVY lub związane z odpornością HR cząsteczki miRNA w ziemniaku i w tytoniu oraz mutacje znalezione w wielofunkcyjnym białku HC-Pro w szczepach PVY dostarczają nowych wyników i są fundamentalne do badań nad mechanizmem zaangażowanym w interakcję PVY-gospodarz.

Skróty

3D: Three-dimensional structure - Trójwymiarowa (3D) struktura.

aa: Amino acid – Aminokwasy.

Ab: Antibody – Przeciwciała.

AGO1: Argonaute 1 - Argonaute 1.

AGO1-2: Isoform 2 of Argonaute 1 - Isoforma 2 Argonaute 1.

CC-NBS-LRR: *R* genes encoding the proteins with the coiled-coil/nucleotide-binding site/leucine-rich repeat domains - Gen *R* kodujący białka posiadające zwinięcie/miejsce wiązania nukleotydów/bogate w leucyny domeny powtórzeń.

CMV*: *Cucumber mosaic virus* - Wirus mozaiki ogórka.

CP: Coat protein - Białko płaszczka.

cv.: Cultivar – Odmiana.

DCL1: Endoribonuclease Dicer homologue 1 - Homolog endorybonukleazy Dicer 1.

ER: Extreme resistance - Skrajna (ekstremalna) odporność.

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - Immunoenzymatyczny test ELISA.

GO: Gene ontology – Ontologia genów.

Gpa2: Disease resistance protein Gpa2 – Białko Gpa2 odporności na choroby.

HC-Pro: Helper component proteinase - Pomocniczy component proteinyazy.

HR: Hypersensitive resistance - Odporność w oparciu o nadwrażliwość.

ITEs: Independent transformation events - Niezależnych transformantów.

LL: Local lesions - Lokalne zmiany.

mAbs: Monoclonal antibodies - Przeciwciała monoklonalne.

miRNA: microRNA – mikroRNA.

mRNAs: messenger RNAs - matrycowe RNA.

MYB33: MYB domain protein 33 – Domena białka MYB 33.

MYB65: MYB domain protein 65 – Domena białka MYB 65.

NBS-LRR: *R* genes encoding proteins with nucleotide binding site and leucine-rich repeat domains - Geny *R* które kodują białka zawierające sekwencje wiązania nukleotydów (NBS) i powtórzenia bogate w leucynę (LRR).

nc: no change – brak zmian.

nsSNP: Non-synonymous single nucleotide polymorphism - Niesynonimiczne polimorfizmy pojedynczego nukleotydu.

nt: Nucleotides – Nukleotydy.

NtTPN1: *R* gene encoding *Nicotiana tabacum* Tolerance to PVY-induced Necrosis 1 protein – Gen *R* kodujący białko wykazujące tolerancję na szczep PVY indukujący nekrozy *Nicotiana tabacum*.

PMTV: *Potato mop-top virus* - Wirus miotlastości wierzchołków ziemniaka.

PTNRD: Potato tuber necrotic ringspot disease - Pierścieniowa nekroza bulw ziemniaka.

PVY: *Potato virus Y* - Wirus Y ziemniaka.

R genes: Plant disease resistance genes - Roślinne geny odporności.
 REL: Relative expression level – Relatywny poziom ekspresji.
 RISC: RNA-induced silencing complex - Kompleks wyciszający indukowany RNA.
 RSS: RNA silencing suppressor - Supresor wyciszania RNA.
 RT-PCR: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction - Reakcja odwrotnej transkrypcji wraz z łańcuchową reakcją polimerazy.
 SAP: Single amino acid polymorphism – Polimorfizm pojedynczego aminokwasu.
 SHR: Systemic hypersensitive resistance - Systemiczna odporność w oparciu o nadwrażliwość
 siRNA: small interfering RNA – Małe interferujące RNA.
 SNP: Single nucleotide polymorphism - Polimorfizm jednego nukleotydu.
 ssRNA: single-stranded RNA - Jednoniciowe RNA.
TIR-NBS-LRR: *R* genes encoding the proteins with the Toll-interleukin-1 receptor/nucleotide-binding site/leucine-rich repeat domains. - Geny *R* kodujące białka z domenami powtórzeń bogatymi w leucynę i receptorem Toll-interleukiny1/ miejsce wiązania nukleotydów/ powtórzenia bogate w leucynę.
TMV: *Tobacco mosaic virus* - Wirus mozaiki tytoniu.
TMV N: The tobacco *N* gene conferring resistance to *Tobacco mosaic virus* - Gen tytoniu *N* powodujący odporność na wirus mozaiki tytoniowej.
 TOE3: Apetala 2-like ethylene-responsive transcription factor TOE3-like – Czynniki transkrypcyjne TOE3- typu Apetala 2 biorący udział w odpowiedzi na etylen.
ToLCNDV: *Tomato leaf curl New Delhi virus* - Wirus kędzierzawości liści pomidora New Delhi.
TRV: *Tobacco rattle virus* - Wirus nekrotycznej kędzierzawki tytoniu.
TuMV: *Turnip mosaic virus* - Wirus mozaiki rzepy.
 VN: Veinal necrosis - Nekrozy nerwów.
 VCl: Vein clearing - Rozjaśnienie nerwów.

*Polskie tłumaczenie nazwy wirusa jest zgodne z Kryczyńskim i Szyndel 2017, 2018 a i b [63; 64; 65].

Literatura

- [1] Adams MJ, Antoniw JF, Beaudoin F (2005) Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. *Mol. Plant Pathol.* 6: 471-487.
- [2] Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297.
- [3] Bazzini AA, Hopp HE, Beachy RN, Asurmendi S (2007) Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 12157-12162.
- [4] Bazzini AA, Manacorda CA, Tohge T, Conti G, Rodriguez MC, Nunes-Nesi A, Villanueva S, Fernie AR, Carrari F, Asurmendi S (2011) Metabolic and miRNA profiling of TMV infected plants reveals biphasic temporal changes. *PLoS One.* 6: e28466.
- [5] Carroll JE, Smith DM, Gray SM (2016) Preferential acquisition and inoculation of PVY^{NTN} over PVY^O in potato by the green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *J. Gen. Virol.* 97: 797-802.
- [6] Chapman EJ, Prokhnevsky AI, Gopinath K, Dolja VV, Carrington JC (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev.* 18: 1179-1186.

- [7] Chikh-Ali M, Maoka T, Natsuaki KT, Natsuaki T (2010) The simultaneous differentiation of *Potato virus Y* strains including the newly described strain PVY^{NTN-NW} by multiplex PCR assay. *J. Virol. Methods* 165: 15–20.
- [8] Chikh-Ali M, Rowley JS, Kuhl J, Gray SM, Karasev AV (2014) Evidence of a monogenic nature of the *Nz* gene conferring resistance against *Potato virus Y* strain Z (PVY^Z) in potato. *Am. J. Potato Res.* 91: 649–54.
- [9] Chrzanowska M (1991) New isolates of the necrotic strain of *Potato virus Y* (PVY^N) found recently in Poland. *Potato Res.* 34: 179-182.
- [10] Chrzanowska M (1994) Differentiation of *Potato virus Y* (PVY) isolates. *Phytopathol. Pol.* 8 (XX): 15–20.
- [11] Chrzanowska M., Doroszevska T (1997) Comparison between PVY isolates obtained from potato and tobacco plants grown in Poland. *Phytopathol. Pol.* 3: 63-71.
- [12] Cillo F, Mascia T, Pasciuto MM, Gallitelli D (2009) Differential effects of mild and severe *Cucumber mosaic virus* strains in the perturbation of microRNA-regulated gene expression in tomato map to the 3' sequence of RNA 2. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22: 1239-1249.
- [13] Cronin S, Verchot J, Haldeman-Cahill R, Schaad MC, Carrington JC (1995) Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* 7: 549-559.
- [14] Davie K, Holmes R, Pickup J, Lacomme C (2017) Dynamics of PVY strains in field grown potato: Impact of strain competition and ability to overcome host resistance mechanisms. *Virus Res.* 241: 95-104
- [15] Domingo E, Sheldon J, Perales C (2012) Viral quasispecies evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76/2: 159-216.
- [16] Du Z, Chen A, Chen W, Westwood JH, Baulcombe DC, Carr JP (2014) Using a viral vector to reveal the role of microRNA159 in disease symptom induction by a severe strain of *Cucumber mosaic virus*. *Plant Physiol.* 164: 1378-1388.
- [17] Dzwonkowski W (2018) Rynek ziemniaków w Europie i na świecie. *Rynek Ziemniaka* 45: 7-11.
- [18] Dzwonkowski W, Szczepaniak I, Zdziarska T, Mieczkowski M (2018) Popyt na ziemniaki. *Rynek Ziemniaka* 45: 21-29.
- [19] Faurez F, Baldwin T, Tribodet M, Jacquot E (2012) Identification of new *Potato virus Y* (PVY) molecular determinants for the induction of vein necrosis in tobacco. *Mol. Plant Pathol.* 13: 948-959.
- [20] Funke CN, Nikolaeva OV, Green KJ, Tran LT, Chikh-Ali M, Quintero-Ferrer A, Cating RA, Frost KE, Hamm PB, Olsen N, Pavek MJ, Gray SM, Crosslin JM, Karasev AK (2017) Strain-specific resistance to *Potato virus Y* (PVY) in potato and its effect on the relative abundance of PVY strains in commercial potato fields. *Plant Dis.* 101: 20-28.
- [21] Guo Y, Jia MA, Yang Y, Zhan L, Cheng X, Cai J, Zhang J, Yang J, Liu T, Fu Q, Zhao J, Shamsi IH (2017) Integrated analysis of tobacco miRNA and mRNA expression profiles under PVY infection provides insight into tobacco-PVY interactions. *Sci. Rep.* 7: 4895.
- [22] Hu X, Meacham T, Ewing L, Gray SM, Karasev AV (2009) A novel recombinant strain of *Potato virus Y* suggests a new viral genetic determinant of vein necrosis in tobacco. *Virus Res.* 143: 68-76.
- [23] Hu X, Meacham T, Ewing L, Gray SM, Karasev AV (2010) A novel recombinant strain of *Potato virus Y* suggests a new viral genetic determinant of vein necrosis in tobacco. *Virus Res.* 143: 68-76.
- [24] Huang T, Wang C, Zhang G, Xie L, Li Y (2012) SySAP: a system-level predictor of deleterious single amino acid polymorphisms. *Protein Cell.* 3: 38-43.
- [25] Hussain A, Arif M, Abbas A, Hussain B, Ali M, Jaffar S (2016) A review on aphid-borne virus (*Potato virus Y*). *J. Entomol. Zool. Stud.* 4: 189-192.

- [26] Jacquot E, Tribodet M, Croizat F, Balme-Sinibaldi V, Kerlan C (2005) A single nucleotide polymorphism-based technique for specific characterization of Y^O and Y^N isolates of *Potato virus Y* (PVY). *J. Virol. Methods* 125: 83-93.
- [27] Jin D, Wang Y, Zhao Y, Chen M (2013) MicroRNAs and their cross-talks in plant development. *J. Genet. Genomics* 40: 161-170.
- [28] Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 19-53.
- [29] Kaliciak A, Syller J (2009) Aphid transmissibility of genetically different isolates of *Potato virus Y* and susceptibility of weeds to virus infection. *Biul. IHAR* 253: 285-295.
- [30] Kasschau KD, Xie Z, Allen E, Llave C, Chapman EJ, Krizan KA, Carrington JC (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Dev. Cell* 4: 205-217.
- [31] Kehoe MA, Jones RA (2011) A proposal to help resolve the disagreement between naming of *Potato virus Y* strain groups defined by resistance phenotypes and those defined by sequencing. *Arch. Virol.* 156: 2273-2278.
- [32] Kehoe MA, Jones RAC, 2016. Improving *Potato virus Y* strain nomenclature: lessons from comparing isolates obtained over a 73-year period. *Plant Pathol.* 65: 322-333.
- [33] Kerlan C (2003/4) Evolution in *Potato virus Y*: from recombination in the genome to emergence and spreading of variants. *Potato Res.* 46: 184.
- [34] Kerlan C, Nikolaeva OV, Hu X, Meacham T, Gray SM, Karasev AV (2011) Identification of the molecular make-up of the *Potato virus Y* strain PVY^Z: genetic typing of PVY^Z-NTN. *Phytopathology.* 101: 1052-1060.
- [35] Khraiweh B, Zhu JK, Zhu J (2012) Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1819: 137-148.
- [36] Kostiw M (2011) The occurrence of major potato viruses in Poland. *J. Plant Prot. Res.* 51: 201-209.
- [37] Kostiw M, Trojanowska E (2011) Impact of feeding time on PVY^N and PVY^{NTN} transmission by *Myzus persicae* (Sulz.). *J. Plant Prot. Res.* 51: 429-434.
- [38] Križnik M, Petek M, Dobnik D, Ramšak Ž, Baebler Š, Pollmann S, Kreuze JF, Žel J, Gruden K (2017) Salicylic acid perturbs sRNA-gibberellin regulatory network in immune response of potato to *Potato virus Y* infection. *Front. Plant Sci.* 8: 2192.
- [39] Lewsey M, Robertson FC, Canto T, Palukaitis P, Carr JP (2007) Selective targeting of miRNA-regulated plant development by a viral counter-silencing protein. *Plant J.* 50: 240-252.
- [40] Li F, Pignatta D, Bendix C, Brunkard JO, Cohn MM, Tung J, Sun H, Kumar P, Baker B (2012) MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 1790-1795.
- [41] Lorenzen JH, Piche LM, Gudmestad NC, Meacham T, Shiel P (2006) A multiplex PCR assay to characterize *Potato virus Y* isolates and identify strain mixtures. *Plant Dis.* 90: 935-40.
- [42] Maia IG, Haenni A, Bernardi F (1996) Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *J. Gen. Virol.* 77: 1335-1341.
- [43] Michel V, Julio E, Candresse T, Cotucheau J, Decors C, Volpatti R, Moury B, Glais L, Dorlhac de Borne F, Decroocq V, German-Retana S (2018) *NiTPNI*: a *RPP8*-like *R* gene required for *Potato virus Y*-induced veinal necrosis in tobacco. *Plant J.* doi: 10.1111/tpj.13980.
- [44] Mondal S, Gray SM (2017) Sequential acquisition of *Potato virus Y* strains by *Myzus persicae* favors the transmission of the emerging recombinant strains. *Virus Res.* 241: 116-124.
- [45] Moury B, Caromel B, Johansen E, Simon V, Chauvin L, Jacquot E, Kerlan C, Lefebvre V (2011) The helper component proteinase cistron of *Potato virus Y* induces hypersensitivity and resistance in potato genotypes carrying dominant resistance genes on chromosome IV. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 24: 787-797.

- [46] Naqvi AR, Haq QM, Mukherjee SK (2010) MicroRNA profiling of *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) infected tomato leaves indicates that deregulation of mir159/319 and mir172 might be linked with leaf curl disease. *Virol J.* 7: 281.
- [47] Rigotti S, Gugerli P (2007) Rapid identification of *Potato virus Y* strains by one-step triplex RT-PCR. *J. Virol. Methods* 140: 90-94.
- [48] Rolland M, Glais L, Kerlan C, Jacquot E (2008) A multiple single nucleotide polymorphisms interrogation assay for reliable *Potato virus Y* group and variant characterization. *J. Virol. Methods* 147: 108-117.
- [49] Rowley J, Karasev A, Gray S (2015) Screening potato cultivars for new sources of resistance to *Potato virus Y*. *Am. J. Potato Res.* 92: 38-48.
- [50] Rupar M, Kogovšek P, Pompe-Novak M, Gutiérrez-Aguirre I, Delaunay A, Jacquot E, Ravnikar M (2013) Assessment of SNaPshot and single step RT-qPCR methods for discriminating *Potato virus Y* (PVY) subgroups. *J. Virol. Methods.* 189: 93-100.
- [51] Scholthof KB, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn T, Hohn B, Saunders K, Candresse T, Ahlquist P, Hemenway C, Foster GD (2011) Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 12: 938-954.
- [52] Shibolet Y, Haronsky E, Leibman D, Arazi T, Wassenegger M, Whitham SA, Gaba V, Gal-On A (2007) The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *J. Virol.* 81: 13135-13148.
- [53] Shivaprasad PV, Chen HM, Patel K, Bond DM, Santos BA, Baulcombe DC (2012) A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs. *Plant Cell* 24: 859-874.
- [54] Singh RP, Valkonen JP, Gray SM, Boonham N, Jones RA, Kerlan C, Schubert J (2008) Discussion paper: The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Arch. Virol.* 153: 1-13.
- [55] Tian YP, Valkonen JP (2013) Genetic determinants of *Potato virus Y* required to overcome or trigger hypersensitive resistance to PVY strain group O controlled by the gene *Ny* in potato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26: 297-305.
- [56] Tian YP, Valkonen JP (2015) Recombination of strain O segments to HCpro-encoding sequence of strain N of *Potato virus Y* modulates necrosis induced in tobacco and in potatoes carrying resistance genes *Ny* or *Nc*. *Mol. Plant Pathol.* 16: 735-747.
- [57] Tribodet M, Glais L, Kerlan C, Jacquot E (2005) 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. Gen. Virol.* 86: 2101-2105.
- [58] Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F (2001) Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res.* 74: 157-175.
- [59] Valkonen JPT (2015) Elucidation of virus-host interactions to enhance resistance breeding for control of virus diseases in potato. *Breed. Sci.* 65: 69-76.
- [60] Valli AA, Gallo A, Rodamilans B, López-Moya JJ, García JA (2018). The HCPro from the *Potyviridae* family: an enviable multitasking Helper Component that every virus would like to have. *Mol. Plant Pathol.* 19: 744-763.
- [61] Voinnet O (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136: 669-687.
- [62] Zhang X, Yuan YR, Pei Y, Lin SS, Tuschl T, Patel DJ, Chua NH (2006) *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.* 20: 3255-3268.
- [63] Kryczyński S, Szyndel MS (2017) Wirusy roślin w aktualnym (2017) układzie taksonomicznym ICTV z propozycjami polskich nazw gatunków. Część 1. Wirusy o genomie w postaci DNA. *Zesz. Problem. Post. Nauk. Roln.* 591, 63–77.

[64] Kryczyński S, Szyndel MS (2018 a) Wirusy roślin w aktualnym (2017) układzie taksonomicznym ICTV z propozycjami polskich nazw gatunków. Część 2. Wirusy o genomie w postaci dsRNA, ssRNA o antysensownej (-) lub ambisensownej (+/-) orientacji oraz nietypowe wirusy o genomie w postaci (+)ssRNA i wiroidy. Zesz. Problem. Post. Nauk. Roln. 592, 51–65.

[65] Kryczyński S, Szyndel MS (2018 b) Wirusy roślin w aktualnym (2017) układzie taksonomicznym ICTV z propozycjami polskich nazw gatunków. Część 2. Wirusy o izometrycznych wirionach oraz genomie (+)ssRNA. Zesz. Problem. Post. Nauk. Roln. 593, 25–38.

5. Pozostałe osiągnięcia badawcze i rozwojowe

Tematem mojej pracy licencjackiej wykonanej na Uniwersytecie Rolniczym w Hebei w Chinach była hodowla odmian pszenicy odpornych na patogeniczne grzyby *Blumeria graminis f. sp. tritici* i *Puccinia recondita f. sp. tritici*, które powodują, odpowiednio, mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną pszenicy. Pokolenie F₁ zostało scharakteryzowane pod względem cech agronomicznych, odporności i jakości ziarna.

Po uzyskaniu tytułu licencjata agronomii w roku 1987, zostałam zatrudniona w Instytucie Bawełny, Akademii Nauk Rolniczych i Leśnych Hebei, w Chinach. Pracowałam na stanowisku asystenta nad hodowlą nowych odmian bawełny odpornych na grzyby *Fusarium vasinfectum* i *Verticillium alboatum*, sprawców dwóch typów wędnięcia bawełny. Uczestniczyłam w różnych etapach hodowli mieszańcowej, m. in. w wyborze linii rodzicielskich, krzyżowaniu, selekcji linii hodowlanych na podstawie odporności oraz cech agronomicznych i jakościowych, uzyskiwaniu linii homozygotycznych przez samozapłodnienie, a także w regionalnych testach odmian bawełny. Jedną z linii hodowlanych, nad których charakterystyką i testami regionalnymi pracowałam, była linia 492, uzyskana z odległych krzyżowań między gatunkami bawełny *Gossypium hirsutum* L., *G. barbadense* L. i dzikimi gatunkami bawełny. Linia ta została oficjalnie zarejestrowana, jako odmiana Jimian 20.

W roku 1997 otrzymałam roczne stypendium Ministerstwa Edukacji Chin, by przyjechać do Polski na wizytę studyjną i kształcić się na SGGW pod kierunkiem prof. Stefana Malepszego. Podczas tej wizyty wykonałam pracę magisterską (eksternistycznie). Opanowałam technikę transformacji roślin z użyciem *Agrobacterium*. Wprowadziłam do genomu ogórka *Cucumis sativus* L. gen reporterowy (*uidA*) pod kontrolą promotora *PR-2d*, który pochodził z tytoniu, z genu związanego z patogenezą. Uzyskałam siedem niezależnych transformantów (*independent transformation events*, ITEs). Przeniesienie transgenu zostało potwierdzone dla roślin T₀ przy użyciu PCR diagnostycznego dla genów *uidA* and *nptII*, podczas gdy detekcja aktywności GUS w kwiatach wskazywała na ekspresję genu *uidA* na poziomie białka. W roku 1998 uzyskałam tytuł magistra ogrodnictwa.

W latach 1998-2002 wykonałam pracę doktorską pod opieką prof. Stefana Malepszego, sfinansowaną przez SGGW. Kontynuowałam prace nad transformacją mikroeksplantatów z liści ogórka z użyciem *Agrobacterium*, jako modelowym systemem transformacji. Podczas moich studiów doktoranckich udoskonaliłam metodę transformacji pod względem: (1) starannego wyboru eksplantatów; (2) zastosowania związku fenolowego, acetosyringonu, podczas inokulacji i ko-kultury w celu indukcji genu *vir*; (3) wyboru tkanek z wysokim potencjałem regeneracyjnym. Ulepszona metoda transformacji okazała się

niezawodna i wysoko powtarzalna. Do wysoko wsobnej linii odmiany ogórka Borszczagowski wprowadzono cztery różne konstrukty i otrzymano w sumie 43 ITEs. Dwa spośród wprowadzonych konstruktów zostały przygotowane w ramach współpracy z Max-Planck-Institute for Plant Molecular Physiology w Golm, w Niemczech. Uzyskano także 48 linii transgeniczných (w tym 14 linii homozygotycznych) pokoleń T1-T3 z konstruktem pPR-2d::*uidA* oraz 165 linii transgeniczných (w tym 13 homozygotycznych) pokoleń T1-T5 z konstruktem zawierającym gen taumatyny (pCaMV35S::*thaumatin*).

W pracy doktorskiej wykorzystałam linie transgeniczne ogórka z konstrukctami pPR-2d::*uidA* i pCaMV35S::*thaumatin* i roślinie te zostały scharakteryzowane pod względem integracji, dziedziczenia i ekspresji transgenów. Uzyskałam stopień naukowy doktora na SGGW w 2002 a także z Ministerstwa Edukacji Chińskiej Republiki Ludowej w roku 2004 z wyróżnieniem. Wyniki mojej pracy doktorskiej zostały opublikowane później, jako oryginalne prace badawcze w recenzowanych czasopismach naukowych (**Yin i in., 2004 a, 2004 c, 2006 a; Filipecki et al. 2005, 2006; Burza et al. 2006; Tagashira et al. 2005** w **Załączniku 4**), a badania związane z transformacją zostały nagrodzone przez Rektora SGGW w roku 2007.

Po doktoracie, w latach 2003 – 2008 byłam zatrudniona w Instytucie Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, na stanowisku adiunkta w laboratorium prof. Tadeusza Rorata. W tym czasie pracowałam nad analizą roli dehydryn w odporności na stres chłodu dwóch gatunków z rodzaju *Solanum*: *S. sogarandinum* and *S. tuberosum*, stosując transgenezę, jako narzędzie. Byłam zaangażowana w realizację dwóch projektów naukowych finansowanych przez Komitet Badań Naukowych, jako główny wykonawca (2 PO6A 030 27, 2004-2006), oraz jako kierownik projektu (2 PO6 023 29, 2005-2008 w **Załączniku 4**). Otrzymałam transgeniczne linie ogórka i ziemniaka z konstrukctami *S. sogarandinum* pGT::*Dhn10* i pGT::*Dhn24* (łącznie 38 ITEs) i zanalizowałam je na poziomie DNA, RNA, białka i fenotypu.

Wyniki wymienionych dwóch projektów naukowych zostały opublikowane, jako oryginalne prace badawcze w recenzowanych czasopismach naukowych (**Yin i in., 2004 b, 2006 b; Rorat i in., 2006; Głodek i in., 2008** w **Załączniku 4**) a osiągnięcie naukowe zatytułowane „Wyizolowanie i zidentyfikowanie genów, których ekspresja jest związana z tolerancją odmian uprawnych ziemniaka oraz dzikiego gatunku *Solanum sogarandinum* na stesy wywołane chłodem, suszą i zasoleniem” zostało nagrodzone przez Wydział Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych PAN w roku 2007.

Od maja 2008 jestem zatrudniona na stanowisku adiunkta w IHAR-PIB/Młochów, a moje zainteresowania badawcze skupiają się wokół molekularnej wirusologii roślin i badań nad wirusowymi patogenami ziemniaka i ich interakcji z gospodarzami.

Od momentu zatrudnienia w IHAR-PIB/Młochów, byłam zaangażowana w realizację dwóch projektów naukowych finansowanych przez UE, którymi w Polsce kierowała prof. Ewa Zimnoch-Guzowska.

Pierwszym z nich był projekt ResistVir poświęcony badaniom nad zastosowaniem genetycznej odporności gospodarza w kontroli wirusów roślin i ich wektorów w europejskich roślinach uprawnych (projekt UE, VI Program Ramowy 2004-2008 w **Załączniku 4**). W ramach projektu ResistVir uczestniczyłam w pierwszym spotkaniu PVYwide w Paryżu oraz złożyłam krótką wizytę studyjną w Science and Advice for Scottish Agriculture (SASA), w Wielkiej Brytanii, by nauczyć się standardowych technik pracy z wirusami pod kierunkiem dr Colina Jeffriesa.

W ramach drugiego projektu pt.: „Wzmoczona kontrola występowania wirusa miotlastości wierzchołków ziemniaka (*Potato mop-top virus*, PMTV) w krajach skandynawskich i basenu Morza Bałtyckiego” (2004-2008), pracowałam nad monitoringiem i diagnostyką PMTV w próbach bulw ziemniaka zebranych w Polsce, a wyniki prac zostały opublikowane wspólnie z innymi europejskimi naukowcami (**Santala i in., 2010 w Załączniku 4**).

W tym samym czasie, od roku 2008, biorę udział w realizacji programu wieloletniego finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi (MRiRW projekt nr: 3-6-00-0-01 2008-2013, 3-1-06-0-01 2008-2013 i PW zad. 3.1 2015-2020). Realizuję zadania polegające na monitoringu, charakteryzowaniu i prowadzeniu kolekcji patogenów wirusowych infekujących uprawy ziemniaka w Polsce, m.in. PVY i wirusa nekrotycznej kędzierzawki tytoniu (*Tobacco rattle virus*, TRV). Uzyskałam finansowanie i kierowałam dwoma projektami badawczymi: (1) projekt nr NN310 304439, 2010-2013, finansowany przez Narodowe Centrum Nauki (NCN); (2) projekt nr 95, 2015-2017, finansowany przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Projekty te pozwoliły mi rozpocząć badania nad miRNA. W ramach obydwu projektów nawiązałam i kontynuowałam współpracę z prof. Baohong Zhang z Uniwersytetu Wschodniej Karoliny, w USA, dotyczącą badań mikroRNA oraz z dr Magdaleną Pawełkiewicz z SGGW w Warszawie w zakresie analiz bioinformatycznych. Wyniki opisanych projektów dotyczące badań PVY (**H1; H2**), oceny reakcji odpornościowych odmian ziemniaka na PVY (**H2**), a także badań miRNA w interakcji PVY z ziemniakiem (**H3**) i tytoniem (**H4**) tworzą moje **osiągnięcie habilitacyjne opisane szczegółowo w punkt 4.c autoreferatu**.

Poza PVY, moje badania wirusologiczne obejmowały także inne zagadnienia związane z wirusami ziemniaka, np. badania TRV (**Yin i in., 2014 a i b; Yin i Michalak 2014; Chrzanowska i in., 2014**), kolekcję patogenów wirusowych (**Gawińska-Urbanowicz i in., 2014; Yin i in., 2017 b**), diagnostykę obecności wirusów w roślinach ziemniaka i w glebie (**Yin i Michalak 2017**) (patrz **Załącznik 4**).

YIN ZHIMIN

.....
Podpis Wnioskodawcy