

Ochrona

BIOLOGIA I DIAGNOSTYKA WIRUSA Y ZIEMNIAKA

BIOLOGY AND DIAGNOSTICS OF POTATO VIRUS Y

dr hab. Krzysztof Treder

IHAR-PIB Oddział w Boninie, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii

e-mail: k.treder@ihar.edu.pl

Streszczenie

Wirus Y ziemniaka (Potato virus Y, PVY) jest typowym przedstawicielem rodzaju Potyvirus, należącego do rodziny Potyviridae. Wirus przenoszony jest głównie przez mszyce w sposób nietrwały i niekrążeniowy, choć może rozprzestrzeniać się wraz z sokiem przez uszkodzenia mechaniczne, przez szczepienie, jak również z wodą. PVY jest obecnie najważniejszym wirusem infekującym ziemniaki. Stanowi poważny problem również w uprawach pomidora, papryki i tytoniu. Od kilku dekad populacja wirusa ulega dynamicznym zmianom. Pojawiają się nowe, rekombinowane szczepy, które wywołują łagodne, trudne do wykrycia objawy na roślinach lub występują bezobjawowo. Często indukują nekrozy na bulwach, przyczyniając się do pogorszenia jakości plonu, a nawet jego dyskwalifikacji. Dlatego z praktycznego punktu widzenia istotne jest wykrywanie wirusa w bardzo niskich koncentracjach i identyfikowanie szczepów powodujących nekrozy bulw. Tradycyjnie do tego celu stosuje się test biologiczny na roślinach ziemniaka o znanym podłożu genetycznym oraz na tytoniu (*Nicotiana tabacum*), uzupełniony o test immunologiczny ELISA różnicujący serotypy O i N wirusa. Metody molekularne oparte na RT-PCR umożliwiają bardziej specyficzną identyfikację szczepów genetycznych. Jednoczesne wykrycie wirusa i rozróżnienie jego serotypów umożliwia test oparty na izotermicznej amplifikacji kwasów nukleinowych techniką RT-LAMP.

Słowa kluczowe: ELISA, RT-LAMP, RT-PCR, wirus Y ziemniaka, ziemniak

Abstract

Potato virus Y (PVY) is a type member of the genus Potyvirus, belonging to the Potyviridae family. The virus is transmitted mainly by aphids in a nonpersistent and noncirculative mode, although it can spread with plant sap through mechanical damage, by grafting and with water. PVY is currently the most crucial virus that infects potatoes. The virus also causes a severe threat in tomato, pepper, and tobacco crops. The virus population has changed dynamically during the last four decades. New, recombinant strains appeared that cause mild, severe to detect symptoms on plants or are asymptomatic. At the same time, they often induce tuber necrosis, contributing to crop disqualification. Therefore, from a practical point of view, it is essential not only to detect the virus but also to identify strains that cause tuber necrosis. Traditionally, necrotic and nonnecrotic strains are differentiated on indicator plants in combination with an immunoassay detecting virus O and N serotypes. Molecular methods based on RT-PCR allow more specific identification of genetic strains. Additionally, simultaneous detection of the virus and differentiation of its serotypes is enabled by a test RT-LAMP - a combination of reverse transcription of RNA to cDNA with isothermal nucleic acid amplification.

Keywords: ELISA, potato, potato virus Y, RT-LAMP, RT-PCR

Wirus Y ziemniaka (PVY) jest typowym przedstawicielem rodzaju *Potyviridae* (Fauquet i in. 2005; Kerlan, Moury 2008). Jest uważany za piąty z dziesięciu najgroźniejszych wirusów roślinnych na świecie (Scholthof i in. 2011) i za najważ-

niejszy wirus infekujący uprawy ziemniaków (Valkonen 2007; Gray i in. 2010; Guzowska i in. 2013, Karasev, Gray 2012). Pod względem światowej konsumpcji ziemniak jest trzecią najważniejszą rośliną uprawną na świecie po ryżu i pszenicy (Devaux i in. 2014). Ma też najwyższą ze wszystkich ro-

ślin wartość energetyczną w stosunku do powierzchni uprawy oraz wysoką wartość odżywczą. Z tych powodów jest uznawany przez Organizację Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) za roślinę strategiczną w zapewnieniu bezpieczeństwa żywnościowego ludzkości (Devaux i in. 2014). Dlatego znaczenie PVY – najważniejszego obecnie wirusowego patogenu tej rośliny – jest szczególnie duże.

Infekcja wirusem może wywołać od 30 do nawet 80% strat w plonie bulw (Kerlan 2006, Valkonen 2007, Kostiw 2013). PVY jest również ważnym patogenem infekującym pomidor, paprykę, tytoń i bakłażan (Kerlan 2006; Kerlan, Moury 2008; Karasev, Gray 2012; Quenouille i in. 2013). Naturalnym rezerwuarem wirusa są liczne chwasty z ponad trzydziestu rodzin roślin okrytonasiennych, głównie z rodziny psiankowatych (Kerlan 2006; Kerlan, Moury 2008; Kaliciak, Syller 2009).

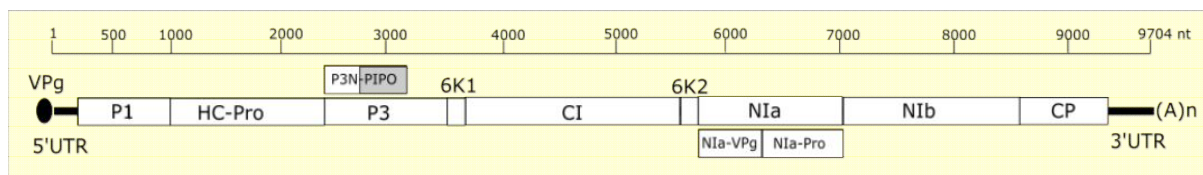
Wirus jest przenoszony zarówno mechanicznie, jak i przez mszyce (Syller 2001; Radcliffe, Ragsdale 2002; Kerlan 2006). W ostatnim przypadku mechanizm przenoszenia polega na specyficznym przytwierdzeniu cząstek wirusa do nabłonka aparatu kłująco-ssącego mszycy i ich uwalnianiu podczas kolejnego żerowania mszycy. Taki sposób przenoszenia jest nazywany niekrążeniowym, ponieważ wiriony nie krążą w ciele owada. Dzięki temu mszyca może w krótkim czasie rozprzestrzenić cząstki wirusa na dużą liczbę roślin. Czas, w jakim to może zrobić, jest jednak stosunkowo krótki i wynosi dla PVY ok. dwóch godzin (Kostiw 1987). Dlatego sposób przenoszenia PVY przez mszyce określany jest również jako nietrwały. Interesujący i obszerny przegląd wiedzy o przenoszeniu wirusów można znaleźć w pracy przeglądowej Syllera (2001).

Głównym wektorem PVY jest mszyca brzoskwiowa (*Myzus persicae*), ale wirus może być również przenoszony przez inne mszyce ziemniaczane, m.in. *Aphis nasturtii*, *Macrosiphum euphorbiae*, *A. frangulae*, *A. solani* (Kostiw 1979; Harrington i in. 1986;

Sigvald 1984; Radcliffe, Ragsdale 2002) i migrujące mszyce nieziemniaczane, m.in. *Hayhurstia atriplicis*, *Hyperomyzus lactucae*, *Rhopalosiphum padi* (Kostiw, Robak 2000, 2002; Verbeek i in. 2010; Mello i in. 2011; Wróbel 2016; Fox i in. 2016; Mondal i in. 2016).

W ostatnich latach wykazano, że za wczesne infekcje PVY odpowiadają mszyce nieziemniaczane, których pierwsze loty mogą wystąpić nawet w pierwszej połowie maja (Kostiw, Robak 2008; Wróbel 2016). W takim terminie rośliny ziemniaka są jeszcze pozabawione związanej z wiekiem odporności polowej, co sprzyja szerzeniu się wirusa mimo małej efektywności transmisji przez mszyce nieziemniaczane (Verbeek i in. 2010).

Wirion PVY ma formę giętkiej nici o długości ok. 800 nm i średnicy 11-14 nm. Jest zbudowany z ok. 2000 cząsteczek białka płaszczka otaczających jedną nić genomowego RNA wirusa (gRNA). Do obu końców wirionu przyłączone są białka wirusowe: pomocnicze (HC-Pro) i inkluzyjne (CI). Genom PVY zbudowany jest z kwasu rybonukleinowego (RNA) złożonego z ok. 9700 (nt) rybonukleotydów. Do 5'-końca gRNA jest kowalencyjnie przyłączone wirusowe białko VPg. Na 3'-końcu gRNA znajduje się łańcuch poliadeninowy (Poli-A). Genomowe RNA koduje białko prekursorowe, które dojrzewa do dziesięciu białek potomnych. Główną rolę w tym procesie pełni proteaza wirusowa NI-Pro, która po autokatalitycznym wyodrębnieniu z białka prekursorowego trawi je na większość białek potomnych z wyjątkiem białka P1 i białka HC-Pro, które również są zdolne do autokatalitycznej proteolizy (Danci i in. 2009). W trakcie replikacji genomu PVY wirusowa polimeraza u ok. 2% potomnych gRNA wstawia dodatkowy nukleotyd – adeninę w obrębie genu kodującego białko P3. Wstawienie powoduje zmianę ramki odczytu w trakcie syntezy białka P3, co prowadzi do powstania białka P3N-PIPO (Chung i in. 2008, Olspert i in. 2016). Budowę wirusa przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Organizacja genomu PVY. Skala nad schematem reprezentuje długość nici RNA wirusa w tysiącach nukleotydów (nt). Region niekodujący białka – UTR. Prostokąty z nazwą białka wirusowego oznaczają poszczególne fragmenty genomu kodujące sekwencje tych białek

Polimerazy wirusowe w trakcie replikacji wirusa popełniają często błędy, dzięki czemu genomy wirusów powstałe w trakcie replikacji wyjściowego genomu znacznie różnią się od niego oraz między sobą. Jest to generalna cecha wirusów, odpowiadająca za ich szybką ewolucję i adaptację do zmian środowiska. Dlatego populację genomów danego wirusa nazywa się quasi-gatunkiem. Pojęcie to oznacza całą pulę zmiennych genomowych RNA tworzących gatunek wirusa. PVY jest typowym quasi-gatunkiem. Charakteryzuje się szybkim tempem ewolucji, wynikającym z wysokiej częstotliwości mutacji punktowych oraz rekombinacji pomiędzy genomami różnych szczepów (Glais i in. 2002; Nie, Singh 2003a; Lorenzen i in. 2006a; Lorenzen i in. 2006b; Schubert i in. 2007; Ogawa i in. 2008; Hu i in. 2009a; Karasev i in. 2011; Cuevas i in. 2012; Visser i in. 2012). Pojawianie się nowych, rekombinowanych szczepów wirusa, które mogą wywoływać łagodne, trudne do wykrycia objawy na roślinach lub występują bezobjawowo, jest jednym z wyzwań w ochronie przed PVY. Nowe rekombinanty często indukują nekrozy bulw, przyczyniając się do pogorszenia jakości plonu lub jego dyskwalifikacji. Również w Polsce infekcje wirusem Y ziemniaka są główną przyczyną dyskwalifikacji plantacji nasiennych (Kostiw 2013; Wróbel, Wąsik 2013).

Rośliny ziemniaka różnią się rodzajem reakcji na infekcje wirusami, w tym na PVY. Odmiany podatne reagują wyraźnymi i zróżnicowanymi objawami chorobowymi. Odmiany tolerancyjne zachowują zdrowy wygląd całej rośliny, jednak mogą reagować obniżonym plonem. Najbardziej pożądanym rodzajem interakcji odmian ziemniaka z wirusem jest odporność, której poziom również jest cechą odmianową. Poziom odporności danej odmiany ziemniaka można zbadać doświadczalnie i wyrazić ilościowo w skali 9-stopnio-

wej, gdzie 1 oznacza całkowitą podatność, a 9 – skrajną odporność na dany wirus.

Odporność determinowaną przez wiele genów nosi miano odporności horyzontalnej (polowej). Warunkują ją m.in. grubość ścian komórkowych, odporność mechaniczna, szybkość ekspresji białek związanych z patogenezą. Ten typ odporności jest związany z wiekiem roślin, starsze rośliny mają wyższy poziom odporności polowej niż młode. Zależy ona również od warunków środowiskowych i nie jest specyficzna, odpowiada raczej za ogólną odporność na różne patogeny a nie na konkretny czynnik chorobotwórczy (Zimnoch-Guzowska i in. 2013). W skali 9-stopniowej warunkuje poziom odporności od 4 do 7.

Dla hodowców ziemniaków bardziej interesująca jest odporność warunkowana przez pojedyncze geny, które w procesie hodowlanym można wprowadzać do nowych odmian. Taki rodzaj odporności określa się mianem wertykalnej. W jej ramach wyróżnia się odporność ekstremalną (ang. extreme resistance, ER), warunkowaną u ziemniaka przez geny R, oraz odporność typu reakcji nadwrażliwości (ang. hypersensitive resistance, HR), determinowaną przez geny N. U odmian noszących geny R dochodzi do blokowania replikacji wirusa, co powoduje, że są one krańcowo odporne na dany wirus (poziom odporności 9 w skali 9-stopniowej). Wprowadzane do ziemniaka jadalnego geny R na PVY pochodzą od dzikich gatunków ziemniaka: gen *Ry_{adg}* od *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* Hawkes, gen *Ry_{sto}* od *S. stoloniferum* Schlecht i gen *Ry_{chc}* od *S. chacoense* Bitt (Zimnoch-Guzowska i in. 2013, Valkonen 2015).

W odporności typu HR wirus może się replikować w zainfekowanych komórkach, lecz produkty genów N powodują, że nie jest zdolny do przemieszczania się między komórkami i w całej roślinie. Zainfekowane komórki obumierają, co objawia się charak-

terystycznymi punktowymi nekrozami na liściach w miejscu infekcji wirusem. Odmiany ziemniaka z genami N w 9-stopniowej skali mają poziom odporności w zakresie 7-8. Geny typu N są powszechne u dzikich gatunków ziemniaka, jak również u odmian ziemniaka jadalnego. Cechą niekorzystną odporności HR jest to, że może być przelamywana w wyższej temperaturze. Jest ona również specyficzna dla poszczególnych szczepów wirusa (Zimnoch-Guzowska i in. 2013, Valkonen 2015).

Z uwagi na ostatnią cechę odporności HR biologiczna klasyfikacja PVY jest oparta na zdolności szczepów do indukowania reakcji nadwrażliwości w odmianach ziemniaka z genami odporności *Ny*, *Nc* i *Nz* oraz do wywoływania nekrozy nerwów lub mozaiki liści na tytoniu (tab. 1). W ten sposób można zdefiniować trzy szczepy nierekombinowane: PVY^C, PVY^N, PVY^O i dwa rekombinowane: PVY^E, PVY^Z (Golnik i in. 2007; Singh i in.

2007; Karasev, Gray 2013; Valkonen 2015). PVY^C i PVY^O indukują reakcję nadwrażliwości w odmianach ziemniaka z genami *Nc* lub *Ny* i mozaikę liści tytoniu. Pierwszy z tych szczepów grupuje głównie izolaty wirusa infekujące głównie paprykę, pomidory i tytoń. PVY^N indukuje ostre systemiczne nekrozy nerwów na tytoniu i infekuje systemicznie odmiany z genami *Nc*, *Ny* i *Nz* bez indukowania reakcji nadwrażliwości (Singh i in. 2007; Gray i in. 2010; Karasev, Gray 2013). PVY^Z wywołuje reakcję nadwrażliwości w odmianach ziemniaka z genem *Nz*, infekuje systemicznie odmiany z genami *Nc* i *Ny* oraz nie indukuje nekrozy nerwów na tytoniu (Jones 1990; Singh i in. 2007; Karasev, Gray 2013). PVY^E podobnie jak PVY^N infekuje systemicznie odmiany z genami *Nc*, *Ny* i *Nz*, lecz w przeciwieństwie do PVY^N nie wywołuje nekrozy nerwów na tytoniu (Kerlan i in. 1999; Singh i in. 2007; Karasev, Gray 2013).

Tabela 1

Klasyfikacja szczepów PVY na roślinach różnicujących odmian ziemniaka o znanym podłożu genetycznym i roślinach tytoniu. VN – nekrozy nerwów, M – mozaika

Odmiany	Szczepy PVY					Genotyp
	PVY ^C	PVY ^O	PVY ^N	PVY ^Z	PVY ^E	
King Edward	HR	S	S	S	S	<i>Nc:ny:nz</i>
Petland Crown Desiree	S	HR	S	S	S	<i>nc:Ny:nz</i>
Petland Ivory Maris Bard	HR	HR	S	HR	S	<i>Nc:Ny:Nz</i>
Tytoń White Burley, Samsun, Xanti	M	M	VN	M	M	

Źródło: Singh i inni 2008

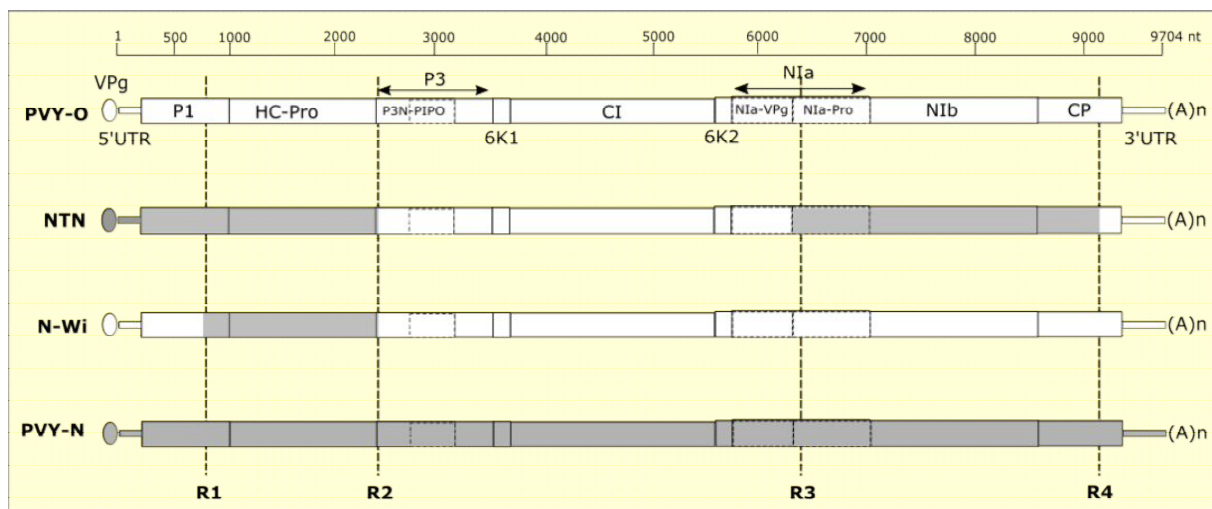
Ta klasyfikacja, oparta na testach biologicznych, jest częściowo odzwierciedlona przez właściwości serologiczne białka płaszczka, które można rozróżnić dla szczepów PVY^C, PVY^O i PVY^N za pomocą przeciwciał monoklonalnych (Gugerli, Fries 1983; Ellis i in. 1996; Cerovska 1998; Ounouna i in. 2002; Nicolaeva i in. 2012; Tian i in. 2014).

Również molekularne różnice między szczepami PVY, których genomy nie powstały w wyniku rekombinacji, częściowo odzwierciedlają klasyfikację na podstawie testów biologicznych. Jednak genomy tych szczepów charakteryzują się wysokim poziomem wewnątrzszczepowego zróżnicowania (Glais i in. 2002; Nie, Singh 2003ab; Lorenzen i in.

2006a; Schubert i in. 2007; Ogawa i in. 2008; Hu i in. 2009; Cuevas i in. 2012; Visser i in. 2012). Przykładem mogą tu być różnice pomiędzy niektórymi izolatami PVY^N z Ameryki Północnej a europejskimi izolatami tego szczepu. Różnice w sekwencji genomów są w tym przypadku tak duże, że wydzielono amerykańskie izolaty jako osobny szczep PVY^{NA-N} (Nie, Singh 2003ab; Karasev, Gray 2013). Również klasyczny szczep PVY^O obejmuje kilka wyraźnie różnych linii genetycznych (Karasev i in. 2011, Ogawa i in. 2012) włącznie z podgrupą PVY^{O5}, której białko płaszczka jest rozpoznawane przez specyficzne dla PVY^N monoklonalne przeciwciała IF5 (Karasev i in. 2010, Nicolaeva i in. 2012). W 2016 r. w Australii opisano nieznaną dotąd nierekombinacyjny szczep PVY^D. Jest on filogenetycznie podobny do PVY^O, lecz infekuje rośliny ziemniaka z genem *Ny*, nie wywołując reakcji nadwrażliwości, i indukuje taką reakcję w odmianach z nowym hipotetycznym genem *Nd* (Kehoe, Jones 2016).

We wczesnych latach 80. XX w. stwierdzono, że niektóre izolaty zaliczane wówczas do PVY^N wywołują nekrotyczną pierścieniową chorobę bulw (ang. potato tuber necrotic ringspot disease, PTNRD), której objawem są płytkie pierścieniowe nekrozy. Izolaty o takich właściwościach zaczęto klasyfikować jako szczep PVY^{NTN} (Beczner i in. 1984, Le Romancer i in. 1994, Glais i in. 2002). Również w latach 80. ubiegłego wieku zaobserwowano, że niektóre izolaty ne-

krotyczne były w stanie infekować odmiany uważane za odporne na PVY. Izolaty te, w przeciwieństwie do typowego PVY^N, indukowały łagodne objawy lub występowały bezobjawowo (Chrzanowska 1991). Tę grupę izolatów PVY sklasyfikowano jako PVY^{N-Wi}, od nazwy odmiany Wilga, w której ten szczep został po raz pierwszy wykryty (Chrzanowska 1991). Badania serologiczne ujawniły, że szczep ten pomimo wywoływania nekroz nerwów na tytoniu posiada serotyp typowy dla PVY^O. Również sekwencja nukleotydowa genu kodującego białko płaszczka w tym szczepie była typowa dla PVY^O (Chachulska i in. 1997). Sekwencjonowanie części i całych genomów PVY^{NTN} i PVY^{N-Wi} wykazało, że oba szczepy powstały na skutek rekombinacji genomów PVY^O i PVY^N (Glais i in. 2002; Nie, Singh 2003a; Lorenzen i in. 2006a; Lorenzen i in. 2006b; Schubert i in. 2007; Ogawa i in. 2008; Hu i in. 2009a; Karasev i in. 2011; Singh i in. 2007; Gray i in. 2010; Crosslin 2012; Karasev, Gray 2013; Quenouille i in. 2013). Do rekombinacji dochodzi najczęściej w czterech regionach genomu PVY (rys. 2). Położenie tych miejsc rekombinacji (ang.: recombinant junctions, Rjs) w genomie wirusa jest stosunkowo konserwatywne, a wymiana fragmentów RNA w ich obrębie prowadzi do powstania dziewięciu najczęściej występujących w przyrodzie rekombinantów PVY: PVY^C, PVY^O, PVY^N, PVY^E, PVY^Z, PVY^{N:O}, PVY^{N-Wi}, PVY^{NA-N} i PVY-NE11 (Hu i in. 2009; Karasev, Gray 2013).



Rys. 2. Schemat przedstawiający rodzicielskie szczepy PVYN (szary) oraz PVYO (biały) oraz rekombinowane szczepy potomne NTN i N-Wi. Miejsca rekombinacji od R1 do R4 wskazano przerywaną linią

Dalsze badania wykazały, że izolaty PVY tradycyjnie klasyfikowane jako PVY^{N-Wi} tworzą dwie grupy, w których segmenty genomu typu "O" pochodzą od dwóch różnych genetycznie linii PVY^O. Są one obecnie klasyfikowane jako PVY^{N-Wi}, zrekombinowany w pozycjach RJ1 i RJ2, oraz PVY^{N:O}, zrekombinowany tylko w pozycji RJ2 (Karasev i in. 2011).

W obrębie szczepu PVY^{NTN} również wyróżniono dwie grupy: PVY^{NTN(A)} zrekombinowany we wszystkich czterech pozycjach (RJ 1-4) oraz PVY^{NTN(B)} z trzema miejscami rekombinacji od RJ 2 do RJ4 (Ogawa i in. 2008). Szczepy PVY^O i PVY^N nie są jedynymi możliwymi przodkami szczepów rekombinowanych. Przykładem może być szczep PVY-NE11 pochodzący z rekombinacji pomiędzy szczepem PVY^{NA-N} i nieznanym izolatem PVY (Lorenzen i in. 2008). Ponadto szczepy pochodzące z rekombinacji także mogą ze sobą rekombinować, czego efektem są takie szczepy jak PVY^E pochodzący od PVY^{NTN} i NE11 (Galvino-Costa i in. 2012a) lub syryjski szczep PVY^{NTN-NW}, będący efektem rekombinacji PVY^{NTN} z PVY^{N-Wi} (Chikh Ali i in. 2010a).

Analiza molekularna genomu PVY^Z ujawniła, że ma on typową strukturę rekombinanta PVY^{NTN}. Zarówno izolaty szczepu PVY^Z, jak i PVY^{NTN} wywołują HR na odmianach z genem *Nz*. Jediną różnicą między nimi są objawy na tytoniu. PVY^Z powoduje mozaikę i przejaśnienie nerwów, natomiast PVY^{NTN} – nekrozy nerwów. W związku z tym, że izolaty PVY^Z i PVY^{NTN} są biologicznie zbliżone lub identyczne, uznano, że powinny być nazywane PVY^{Z-NTN} (Kerlan i in. 2011). W efekcie współczesna klasyfikacja PVY podejmuje próbę połączenia tradycyjnej klasyfikacji opartej na symptomach wywoływanych przez PVY na odmianach ziemniaka z różnicującymi genami odporności oraz na tytoniu z danymi na temat organizacji molekularnej genomów PVY (Karasev, Gray 2013). Sprawa jest jednak skomplikowana, ponieważ oba systemy nie zawsze dobrze do siebie pasują. Przykładem tego mogą być izolaty PVY molekularnie typowane jako PVY^O, a biologicznie jako PVY^Z. Kolejnym przykładem jest nowo odkryty nierekombinacyjny szczep PVY^D, który na poziomie molekularnym identyfikowany jest jako PVY^C, lecz nie

wywołuje reakcji HR w roślinach ziemniaka z genem *Nc*. W celu uporządkowania skomplikowanego nazewnictwa filogenetycznego PVY zaproponowano stosowanie łańciskich liczb (Kehoe, Jones 2011, 2016).

W ciągu ostatnich trzech dekad wzrasta udział szczepów rekombinowanych w światowej populacji wirusa Y ziemniaka (Hu i in. 2009; Chikh Ali i in. 2010a, 2016ab; Galvino-Costa i in. 2012b; Schubert i in. 2015). Jest to szczególnie widoczne w przypadku PVY^{NTN} i PVY^{N-Wi}, które niemal całkowicie zastąpiły stare szczepy nierekombinacyjne w Europie (Yin i in. 2012, Zimnoch-Guzowska i in. 2013, Lindner i in. 2015). Również w Ameryce Północnej, gdzie PVY^O do niedawna dominował (Gray i in. 2010), w ciągu zaledwie kilku lat został on niedawno prawie całkowicie zastąpiony przez szczepy PVY^{N-Wi} i PVY^{NTN} (Benedict i in. 2015, Funke i in. 2017). Tak dramatyczna szybkość zmian w strukturze genetycznej populacji PVY może wynikać z selektywnej podatności odmian ziemniaka na rekombinowane szczepy PVY (Linder i in. 2015, Funke i in. 2017).

Jednakże reakcja danej odmiany ziemniaka na dany szczep wirusa może być również determinowana przez inne czynniki niż tylko sama interakcja genotypów wirusa i rośliny, ponieważ nowe szczepy mogą wywołać zarówno ostre, jak i łagodne objawy, a także wystąpić bezobjawowo na tym samym genotypie ziemniaka (Lindner i in. 2015). Szczególnie infekcje bezobjawowe popularnych odmian ziemniaka stanowią wyzwanie w zwalczaniu PVY (Nie i in. 2012; Karasev, Gray 2013; Lindner i in. 2015; Benedict i in. 2015). Ponadto nie tylko PVY^{NTN}, lecz również inne szczepy, włącznie z nierekombinowanymi (PVY^O, PVY^N, PVY^{N-NA}) i rekombinowanymi (PVY^E, PVY^{NTN-NW}, PVY-NE11), mogą indukować płytkie nekrozy – nekrotyczną pierścieniową chorobę bulw (PTNRD), wewnętrzne nekrozy, jak również deformacje całych bulw u podatnych odmian ziemniaka, co znacząco zwiększa znaczenie ekonomiczne tych szczepów (Karasev, Gray 2013; Benedict i in. 2015).

W badaniach zmian w strukturze populacji wirusa Y w Polsce również stwierdzono zmianę frekwencji występowania szczepów. W latach 80. XX w. szczep PVY^O stanowił 90% populacji, ale w ciągu kolejnych sześciu

lat nastąpiły duże zmiany: stwierdzono, że szczepem dominującym stał się PVY^{N-Wi} wykrywany w 90% przypadków. Szczep PVY^{NTN} wykryto po raz pierwszy w Polsce w 1994 r., a jego występowanie systematycznie rosło w kolejnych latach (Zimnoch-Guzowska i in. 2013). Obecnie największy udział w populacji mają dwa szczepy: PVY^{NTN} i PVY^{N-Wi} (Yin i in. 2012).

Dlatego, aby uzupełnić wizualną ocenę objawów infekcji PVY na roślinach różnicujących odmian ziemniaka i tytoniu, wykrywanie i różnicowanie szczepów PVY musi obejmować enzymatyczny test immunologiczny ELISA z przeciwciałami monoklonalnymi, które specyficznie rozpoznają białka płaszcza PVY^C, PVY^O i PVY^N (Ounouna i in. 2002;

Singh i in. 2007; Karasev, Gray 2013; Nicolaeva i in. 2012; Tian i in. 2014) lub test multipleks (m)RT-PCR różnicujący szczepy (Weilguny, Singh 1998; Singh i in. 2002; Boonham i in. 2002; Nie, Singh 2003b) – rysunek 3. Opracowane techniki (m)RT-PCR dobrze różnicują szczepy wirusa. Opierając się na konserwatywnych pozycjach regionów RJ, można projektować startery, dzięki którym identyfikacja szczepów genetycznych jest stosunkowo prosta (Lorenzen i in. 2006b; Rigotti, Gugerli 2007; Schubert i in. 2007). Najbardziej precyzyjny test (m)RT-PCR wykorzystuje pięć możliwych pozycji regionów RJ1-RJ4 (włącznie z dwoma możliwymi regionami dla RJ3 i RJ3a) (Chikh i in. 2010b, 2013).

Test immunologiczny

ELISA:

- przeciwciała PVY
- przeciwciała PVY^N
- przeciwciała PVY^{O/C}

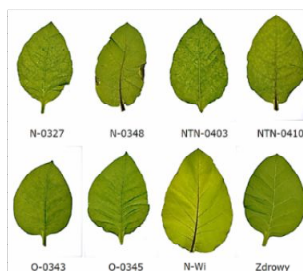
	Y	Y ^N	Y ^{O/C}
N	+	+	-
NTN	+	+	-
N-W	+	-	+
O	+	-	+

Test biologiczny

tytoń odm. *Samsun*
odmiany ziemniaka

- King Edward,
- Desiree,
- Pentland Ivory

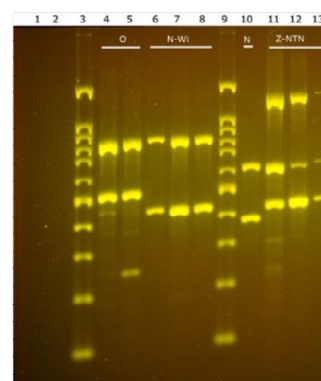
(Singh i in. 2008)



Test molekularny

Multiplex RT-PCR:

Chikh i in. 2010



Rys. 3. Metody stosowane do różnicowania i identyfikacji szczepów PVY

Ostatnio zespół z Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii (PDMiB) w oddziale IHAR-PIB w Boninie wykazał, że metoda izolacji RNA może znacząco wpłynąć na czułość wykrywania PVY testem RT-PCR i że izolacja RNA na krzemionce upraszcza procedurę wykrywania oraz umożliwia uzyskanie wysokiej czułości przy jednocześnie obniżonych kosztach detekcji (Zacharzewska i in. 2014). W ciągu ostatniego dziesięciolecia opracowano szereg wariantów izotermicznego testu RT-LAMP (RT-LAMP, Notomi i in. 2015) do wykrywania PVY (Nie 2005, Hasiów-Jaroszewska i in. 2015) oraz innych wirusów roślin (Hasiów-Jaroszewska, Borodynko 2013; Budziszewska i in. 2016). Test RT-LAMP jest mniej wrażliwy na inhibi-

tory amplifikacji niż RT-PCR (Kaneko i in. 2007), ma większą czułość, jest łatwiejszy do wykonania i zachodzi szybciej niż RT-PCR (Przewodowska i in. 2015).

Zespół PDMiB opracował fluorescencyjny wariant testu RT-LAMP oparty na starterach Y5, umożliwiający wykrycie wirusa w ok. 50 min z izolacją RNA włącznie. Czułość testu była dziesięciokrotnie wyższa od RT-PCR i tysiącokrotnie wyższa od testu ELISA i testów paskowych (Przewodowska i in. 2015). Efektem kontynuacji badań było opracowanie starterów Y4, które w porównaniu z testem opracowanym na starterach Y5 pozwoliły zwiększyć czułość RT-LAMP czasu rzeczywistego o rząd wielkości (z 0,1 do 0,01 pg całkowitego RNA w reakcji). Za-

projektowane startery umożliwiły również różnicowanie izolatów PVY pod względem genotypów białka płaszczka o serotypie N lub O.

Skuteczność opracowanych starterów w wykrywaniu i różnicowaniu PVY weryfikowano na wielu europejskich izolatach PVY, jak również – dzięki nawiązaniu współpracy z dr Aurelią Rakotondrafarą (Wisconsin University, Plant Pathology Department, Madison, USA) – na izolatach PVY z Ameryki Północnej. Badane izolaty reprezentowały różne szczepy genetyczne PVY. Kompletna procedura wykrywania PVY obejmowała szybką (20 min) izolację RNA z tkanek ziemniaka za pomocą nanocząstek magnetycznych oraz test RT-LAMP, pozwalający wykryć PVY zależnie od jego koncentracji w próbce w ciągu 8-20 min. Wykazano, że test RT-LAMP w badaniach laboratoryjnych ma taką samą czułość jak RT-PCR w czasie rzeczywistym. W badaniach polowych za pomocą RT-PCR w czasie rzeczywistym wykryto znacznie mniej bulw porażonych PVY niż za pomocą RT-LAMP. Jednocześnie skuteczność RT-LAMP była w tym doświadczeniu porównywalna ze skutecznością oceny roślin z prób oczkowych (Treder i in. 2018).

Literatura

- Beczner L., Horváth J., Romhányi I., Förster H. 1984.** Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. – *Potato Res.* 27: 339-352;
- Benedict C. A., McMoran D. W., Inglis D. A., Karasev A. V. 2015.** Tuber symptoms associated with recombinant strains of Potato virus Y in specialty potatoes under Western Washington growing conditions. *Am. J. – Potato Res.* 92: 593-602;
- Boonham N., Walsh K., Preston S., North J., Smith P., Barker I. 2002.** The detection of tuber necrotic isolates of Potato virus Y, and the accurate discrimination of PVY(O), PVY(N) and PVY(C) strains using RT-PCR. – *J. Virol. Methods* 102: 103-112;
- Budziszewska M., Wieczorek P., Obrępańska-Stęplowska A. 2016.** One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for detection of tomato torrado virus. – *Arch. Virol.* 161: 1359-1364;
- Cerovska N. 1998.** Production of monoclonal antibodies to potato virus YNTN strain in their use for strain differentiation. – *Plant Pathol.* 47, 505-509;
- Chachulska A. M., Chrzanowska M., Robaglia C., Zagorski W. 1997.** Tobacco vein necrosis determinants are unlikely to be located within the 5' and 3' terminal sequences of the potato virus Y genome. – *Arch. Virol.* 142: 765-779;
- Chikh Ali M., Gray S. M., Karasev A. V. 2013.** An improved multiplex IC-RT-PCR assay distinguishes nine strains of Potato virus Y. – *Plant Dis.* 97:1370-1374;
- Chikh Ali M., Alruwaili H., Vander Pol D., Karasev A. V. 2016a.** Molecular characterization of recombinant strains of Potato virus Y from Saudi Arabia. – *Plant Dis.* 100: 292-297;
- Chikh Ali M., Maoka T., Natsuaki T., Karasev A. V. 2012.** A new recombinant Potato virus Y isolate classified as belonging to PVY Z strain group may help to define viral determinant responsible for tuber necrosis in potato. – *Phytopathology* 102: S.4.23;
- Chikh Ali M., Maoka T., Natsuaki T., Natsuaki K. T. 2010a.** PVY^{NTN-NW}, a novel recombinant strain of Potato virus Y predominating in potato fields in Syria. – *Plant Pathol.* 59: 31-41;
- Chikh Ali M., Maoka T., Natsuaki K. T., Natsuaki T. 2010b.** 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;
- Chikh-Ali M., Bosque-Perez N., Vander Pol D., Sembel D., Karasev A. V. 2016b.** Occurrence and molecular characterization of recombinant Potato virus YNTN 491 (PVYNTN) isolates from Sulawesi, Indonesia. – *Plant Dis.* 100: 269-275;
- Chrzanowska M. 1991.** New isolates of the necrotic strain of potato virus Y (PVY N) found recently in Poland. – *Potato Res.* 34: 179-182;
- Chung B. Y. W., Miller W. A., Atkins J. F., Firth A. E. 2008.** An overlapping essential gene in the Potyviridae. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 5897-5902;
- Crosslin J. M. 2012.** PVY: An old enemy and a continuing challenge. – *Am. J. Potato Res.* 90: 2-6;
- Cuevas J. M., Delaunay A., Visser J. C., Bellstedt D. U., Jacquot E., Elena S. F. 2012.** Phylogeography i molecular evolution of Potato virus Y. *PLoS ONE* 7(5): e37853., doi: 10.1371/journal.pone.0037853;
- Devaux A., Kromann P., Ortiz O. 2014.** Potatoes for sustainable global food security. – *Potato Res.* 57:185-199;
- Danci O., Ziegler A., Torrance L., Gasemi S., Danci M. 2009.** Potyviridae family-short review. – *J. Horticult. For. Biotechnol.* 13: 410-420;
- Ellis P., Stace-Smith R., Bowler G., Mackenzie D. J. 1996.** Production of monoclonal antibodies for detection and identification of strains of potato virus Y. – *Can. J. Plant Pathol.* 1: 64-70;
- Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L. A. 2005.** Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier San Diego, CA, USA;
- Fox A., Collins L., Macarthur R., Blackburn L. F., Northing P. 2016.** New aphid vectors and efficiency of transmission of Potato virus A and strains of Potato virus Y in the UK. – *Plant Pathol.*

- 66: 325-335; **22. Funke C. N., Nikolaeva O. V., Green K. J., Tran L. T., Chikh-Ali M., Quintero-Ferrer A., Cating R. A., Frost K. E., Hamm P. B., Olsen N., Pavsek M. J., Gray S. M., Crosslin J. M., Karasev A. V. 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; **23. Galvino-Costa S. B. F., dos Reis Figueira A., Camargos V. V., Geraldino P. S., Hu X.-J., Nikolaeva O. V., Kerlan C., Karasev A. V. 2012a.** A novel type of Potato virus Y recombinant genome, determined for the genetic strain PVY E. – *Plant Pathol.* 61: 388-398; **24. Galvino-Costa S. B. F., dos Reis Figueira A., Rabelo-Filho F. A. C., Moraes F. H. R., Nikolaeva O. V., Karasev, A. V. 2012b.** Molecular typing of Potato virus Y isolates from Brazil reveals a diverse set of recombinant strains. – *Plant Dis.* 96: 1451-1458; **25. Glais L., Tribodet M., Kerlan C., Rheu R. 2002.** Genomic variability in Potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY(N)W and PVY(NTN) variants are single to multiple recombinants between PVY(O) i PVY(N) isolates. – *Arch. Virol.* 147: 363-378; **26. Golnik K., Syller J., Chrzanowska M., Sztangret-Wiśniewska J. 2007.** Metody identyfikacji szczepów wirusa Y ziemniaka. – *Prog. Plant Prot.* 47: 94-96; **27. Gray S., De Boer S., Lorenzen J., Karasev A., Whitworth J., Nolte P., Singh R., Boucher A., Xu H. 2010.** Potato virus Y: An evolving concern for potato crops in the United States i Canada. – *Plant Dis.* 94: 1384-1397; **28. Gugerli P., Fries P. 1983.** Characterization of monoclonal antibodies to potato virus Y and their use for virus detection. – *J. Gen. Virol.* 64: 2471-2477; **29. Harrington R., Katis N., Gibson R. W. 1986.** Field assessment of the relative importance of different aphid species in the transmission of potato virus Y. – *Potato Res.* 29: 67-76; **30. Hasiów-Jaroszewska B., Borodynko N. 2013.** Detection of Pepino mosaic virus isolates from tomato by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. – *Arch. Virol.* 158: 2153-2156; **31. Hasiów-Jaroszewska B., Stachecka J., Minicka J., Sowiński M., Borodynko N. 2015.** Variability of Potato virus Y in tomato crops in Poland and development of a reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification method for virus detection. – *Phytopathology* 105: 1270-1276; **32. Hu X., Karasev A. V., Brown C. J., Lorenzen J. H. 2009.** Sequence characteristics of Potato virus Y recombinants. – *J. Gen. Virol.* 90: 3033-3041; **33. Jones R. A. C. 1990.** Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. – *Ann. Appl. Biol.* 117: 93-105; **34. Kaliciak A., Syller J. 2009.** New hosts of Potato virus Y (PVY) among common wild plants in Europe. – *Eur. J. Plant Pathol.* 124: 707-713; **35. Kaneko H., Kawana T., Fukushima E., Suzutani T. 2007.** Tolerance of loop-mediated-isothermal amplification to a culture medium and biological substances. – *J. Biochem. Biophys. Methods* 70: 499-501; **36. Karasev A. V., Gray S. M. 2012.** Genetic diversity of Potato virus Y complex. – *Am. J. Potato Res.* 90: 7-13; **37. Karasev A. V., Gray S. M. 2013.** Continuous and emerging challenges of Potato virus Y in potato. – *Ann. Rev. Phytopathol.* 51: 571-586; **38. Karasev A. V., Hu X., Brown C. J., Kerlan C., Nikolaeva O. V., Crosslin J., Gray S. M. 2011.** Genetic diversity of the ordinary strain of Potato virus Y (PVY) and origin of recombinant PVY strains. – *Phytopathology* 101: 778-785; **39. Karasev A. V., Whitworth J., Lorenzen J. H., Gray S. M., Nikolaeva O. V., Hu X., Sieloff Z. 2010.** Serological properties of ordinary and necrotic isolates of Potato virus Y: a case study of PVY^N misidentification. – *Am. J. Potato. Res.* 87: 1-9; **40. Kehoe M. A., Jones R. A. C. 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; **41. Kehoe M. A., Jones R. A. C. 2016.** Improving Potato virus Y strain nomenclature: Lessons from comparing isolates obtained over a 73-year period. – *Plant Pathol.* 65: 322-333; **42. Kerlan C. 2006.** Potato virus Y. Descriptions of plant viruses, no. 414. Retrieved from <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=414>; **43. Kerlan C., Moury B. 2008.** Potato virus Y. [In:] *Encyclopedia of Virology*. B. W. J. Mahy, M. H. V. Van Regenmortel eds. Third Edition, Vol. 4. Elsevier Oxford, UK: 287-296; **44. Kerlan C., Tribodet M., Glais L., Guillet M. 1999.** Variability of Potato virus Y in potato crops in France. *J. Phytopathol.* 147: 643-651; **45. Kerlan C., Nikolaeva O. V., Hu X., Meacham T., Gray S. M., Karasev A. V. 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; **46. Kostiw M. 1979.** Transmission of Potato virus Y by *Rhopalosiphum padi* L. – *Potato. Res.* 22: 237-238; **47. Kostiw M. 1987.** Przenoszenie ważniejszych wirusów ziemniaka przez mszyce. *Rozpr. habilit. Inst. Ziemn. Bonin:* 105 s.; **48. Kostiw M. 2013.** Nasiennictwo ziemniaka w Polsce: uwarunkowania przyrodnicze, odmianowe i rynkowe. – *Biul. IHAR* 268: 129-142; **49. Kostiw M., Robak B. 2000.** Pressure variability of aphids – vectors of potato viruses in Poland. – *J. Plant Prot. Res.* 40: 55-59; **50. Kostiw M., Robak B. 2002.** The spread of PVY, PVM, PVS and PLRV at Bonin conditions during 1996-1999. – *J. Plant Prot. Res.* 42: 165-171; **51. Kostiw M., Robak B. 2008.** Skład gatunkowy, termin

- migracji i dynamika liczebności mszyc „nieziemniaczanych” w uprawie ziemniaka w różnych rejonach kraju. – Prog. Plant Prot. 48: 881-888; **52. Lenarčič R., Morrisset D., Pirc M., Llop P., Ravnikar M., Dreo T. 2014.** Loop-mediated isothermal amplification of specific endoglucanase gene sequence for detection of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. PLoS ONE, 9(4): e96027. doi:10.1371/journal.pone.0096027; **53. Le Romancer M., Kerlan C., Nedellec M. 1994.** Biological characterization of various geographical isolates of Potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. – Plant Pathol. 43: 138-144; **54. Lindner K., Trautwein F., Kellermann A., Bauch G. 2015.** Potato virus Y (PVY) in seed potato certification. – J. Plant Dis. Prot. 122: 109-119; **55. Lorenzen J., Nolte P., Martin D., Pasche J. S., Gudmestad N. C. 2008.** NE-11 represents a new strain variant class of Potato virus Y. – Arch. Virol. 153: 517-525; **56. Lorenzen J. H., Meacham T., Berger P. H., Shiel P. J., Crosslin J. M., Hamm P. B., Kopp K. 2006a.** Whole genome characterization of Potato virus Y isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada. – Arch. Virol. 151: 1055-1074; **57. Lorenzen J. H., Piche L. M., Gudmestad N. C., Meacham T., Schiel P. 2006b.** A multiplex PCR assay to characterize Potato virus Y isolates and identify strain mixtures. – Plant Dis. 90: 935-940; **58. Mello A. F. S., Olarte R. A., Gray S. M., Perry K. L. 2011.** Transmission efficiency of Potato virus Y strains PVYO and PVYN-Wi by five aphid species. – Plant Dis. 95: 1279-1283; **59. Mondal S., Wenninger E. J., Hutchinson P. J. S., Whitworth J. L., Shrestha D., Eigenbrode S. D., Bosque-Pérez N. A. 2016.** Comparison of transmission efficiency of various isolates of Potato virus Y among three aphid vectors. – Entomol. Exp. Appl. 158: 258-268; **60. Nie X. 2005.** Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of Potato Virus Y. – Plant Dis. 89: 605-610; **61. Nie X., Singh R. P. 2003a.** Evolution of North American PVY NTN strain Tu660 from local PVY N by mutation rather than recombination. – Virus Genes 26: 39-47; **62. Nie X., Singh R. P. 2003b.** Specific differentiation of recombinant PVY^{N:O} and PVY^{NTN} isolates by multiplex RT-PCR. – J. Virol. Methods 113: 69-77; **63. Nie B., Singh M., Murphy A., Sullivan A., Xie C., Nie X. 2012.** Response of potato cultivars to five isolates belonging to four strains of Potato Virus Y. – Plant Dis. 96: 1422-1429; **64. Nikolaeva O. V., Roop D. J., Galvino-Costa S. B. F., Figueira A. D., Gray S. M., Karasev A. V. 2012.** Epitope mapping for monoclonal antibodies recognizing tuber necrotic isolates of Potato virus Y. – Am. J. Potato Res. 89: 121-128; **65. Notomi T., Mori Y., Tomita N., Kanda H. 2015.** Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. – J. Microbiol. 53: 1-5; **66. Ogawa T., Nakagawa A., Hataya T., Ohshima K. 2012.** The genetic structure of populations of Potato virus Y in Japan; based on the analysis of 20 full genomic sequences. – J. Phytopathology 160: 661-673; **67. Ogawa T., Tomitaka Y., Nakagawa A., Ohshima K. 2008.** Genetic structure of a population of Potato virus Y inducing potato tuber necrotic ring spot disease in Japan; comparison with North American and European populations. – Virus Res. 131: 199-212; **68. Olsper A., Chung B. Y., Atkins J. F., Carr J. P., Firth A. E. 2015.** Transcriptional slippage in the positive-sense RNA virus family Potyviridae. – EMBO Rep. 16: 995-1004; **69. Ounouna H., Kerlan C., Lafaye P., Loukili MJ., ElGaaied A. 2002.** Production of monoclonal antibodies against synthetic peptides of the N-terminal region of Potato virus Y coat protein and their use in PVY strain differentiation. – Plant Pathol. 51: 487-494; **70. Przewodowska A., Zacharowska B., Chołuj J., Treder K. 2015.** A one-step, real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay to detect Potato virus Y. – Am. J. Potato Res. 92: 303-311; **71. Quenouille J., Vassilakos N., Moury B. 2013.** Potato virus Y: a major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity. – Mol. Plant Pathol. 14: 439-452; **72. Radcliffe E. B., Ragsdale D. W. 2002.** Aphid-transmitted potato viruses: The importance of understanding vector biology. – Am. J. Potato Res. 79: 353-386; **73. Rigotti S., Gugerli P. 2007.** Rapid identification of Potato virus Y strains by one-step triplex RT-PCR. – J. Virol. Methods. 140: 90-94; **74. Scholthof K. B. G., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G. D. 2011.** Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. – Mol. Plant Pathol. 12: 938-954; **75. Schubert J., Fomitcheva V., Sztangret-Wiśniewska J. 2007.** Differentiation of Potato virus Y strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. – J. Virol. Methods 140: 66-74; **76. Schubert J., Thieme T., Thieme R., Ha C. V., Hoang G. T. 2015.** Molecular and biological characterization of Potato virus Y isolates from Vietnam. – J. Phytopathol. 163: 620-631; **77. Sigvald R. 1984.** The relative efficiency of some aphid species as vectors of potato virus Y^O (PVY^O). – Potato Res. 27: 285-290; **78. Singh R. P., Nie X., Singh M., Coffin R., Duplessis P. 2002.** Sodium sulphite inhibition of potato and cherry polyphenolics in nucleic acid extraction for virus detection by RT-PCR. – J. Virol. Methods 99: 123-131; **79. Singh R. P., Valkonen J. P. T., Gray S.**

- M., Boonham N., Jones R. A. C., Kerlan C., Schubert J. 2007.** Brief Review Discussion paper: The naming of Potato virus Y strains infecting potato. – Arch. Virol. 153: 1-13; **80. Syller J. 2001.** Mechanizmy przenoszenia wirusów roślinnych i zwierzęcych przez stawonogi. – Kosmos 50: 29-38; **81. Tian Y-P., Hepojoki J., Ranki H., Lankinen H., Valkonen J.P.T. 2014.** Analysis of Potato virus Y coat protein epitopes recognized by three commercial monoclonal antibodies. PLoS ONE 9(12): e115766. doi:10.1371/journal.pone.0115766; **82. Treder K., Chołuj J., Zacharzewska B., Babujee L., Mielczarek M., Burzyński A., Rakoton-drafara A. M. 2018.** Optimization of a magnetic capture RT-LAMP assay for fast and real-time detection of potato virus Y and differentiation of N and O serotypes. – Arch. Virol. 163: 447-458; **83. Valkonen J. P. 2007.** Viruses: economical losses and biotechnological potential. [In:] Potato biology and biotechnology: Advances and perspectives. Vreugdenhil D. et al., eds. Elsevier Amsterdam: 619-641; **84. Valkonen J. P. 2015.** Elucidation of virus-host interactions to enhance resistance breeding for control of virus diseases in potato. – Breed. Sci. 65: 68-76; **85. Verbeek M., Piron P. G. M., Dulleman A. M., Cuperus C., van der Vlugt R. A. A. 2010.** Determination of aphid transmission efficiencies for N, NTN and Wilga strains of Potato virus Y. – Ann. Appl. Biol. 156: 39-49; **86. Visser J. C., Bellstedt D. U., Pirie M. D. 2012.** The recent recombinant evolution of a major crop pathogen, Potato virus Y. PLoS ONE: 7(11): e50631. doi:10.1371/journal.pone.0050631; **87. Weilguny H., Singh R. P. 1998.** Separation of Slovenian isolates of PVY(NTN) from the North American isolates of PVY(N) by a 3-primer PCR. – J. Virol. Methods 71: 57-68; **88. Wróbel S., Wąsik A. 2013.** Seed Potato Production in Poland. – Am. J. Potato Res. 91: 260-268; **89. Wróbel S. 2015.** The rate of virus spread in new potato cultivars in the north of Poland. – Potato Res. 58: 329-342; **90. Yin Z., Chrzanowska M., Michalak K., Zagórska H., Zimnoch-Guzowska E. 2012.** Recombinants of PVY strains predominate among isolates from potato crops in Poland. – J. Plant Prot. Res. 52: 214-219; **91. Zacharzewska B., Przewodowska A., Treder K. 2014.** The adaptation of silica capture RT-PCR for the detection of Potato virus Y. – Am. J. Potato Res. 91: 525-531; **92. 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: 201-227

