

ANNA LITWINIEC¹, NATASZA BORODYNKO², SANDRA CICHORZ¹,
NATALIA RYMELSKA², MARIA GOŚKA¹

¹*Institut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
Państwowy Instytut Badawczy,
Zakład Genetyki i Hodowli Roślin Korzeniowych
Powstańców Wielkopolskich 10, 85-090 Bydgoszcz*

²*Institut Ochrony Roślin
Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Wirusologii i Bakteriologii
W. Węgorka 20, 60-318 Poznań
E-mail: a.litwiniec@ihar.bydgoszcz.pl*

ŹRÓDŁA I MECHANIZMY ODPORNOŚCI BURAKA CUKROWEGO ORAZ DZIKICH FORM Z RODZAJU BETA NA BNYVV

WPROWADZENIE

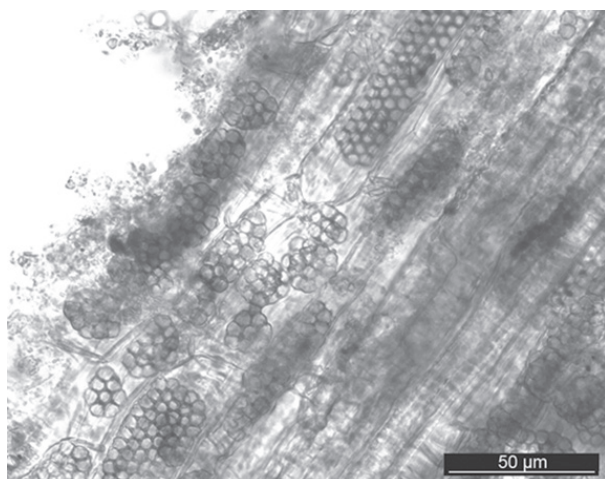
Wirus nekrotycznego żółknięcia nerwów buraka (ang. Beet necrotic yellow vein virus, BNYVV), wywołujący rizomanię buraka cukrowego, może przyczynić się do znaczących strat ilości i jakości plonu w skali światowej (SCHOLTEN i LANGE 2000, RUSH i współaut. 2006). Obecnie choroba ta występuje w większości obszarów uprawy buraka cukrowego. Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, jedyną skuteczną metodą walki w przypadku

porażenia pola jest uprawa odmian tolerancyjnych, pozwalająca na ograniczenie namnażania i rozprzestrzeniania wirusa (LENNEFORS 2006, DE BIAGGI i współaut. 2010). Jednocześnie, żaden ze znanych genów odporności nie zapobiega całkowicie porażeniu, a w materiałach częściowo odpornych najczęściej dochodzi do asymptomatycznej infekcji o zakresie występowania ograniczonym do tkanki korzenia (DE BIAGGI i współaut. 2010).

CZYNNIKI PATOGENNE ORAZ SYMPTOMY CHOROBY

Wirus BNYVV jest przenoszony przez grzybopodobnego pierwotniaka *Polymyxa betae* występującego w glebie (KESKIN 1964). Podczas wzrostu roślin w glebie zawierającej tego patogeny dochodzi do uwolnienia pierwotnych zoospor, czyli dwuwiciowych, zdolnych do aktywnego przemieszczania się form pierwotniaka z otoczonych grubą ścianą sporoczynkowych. Zoospory przyczepiają się do powierzchni korzenia i po utracie wici tworzą cysty, w obrębie których uformowane zostają specjalne elementy umożliwiające penetrację ściany komórkowej. Infekcja wirusowa następuje poprzez wprowadzenie

zawartości cysty do komórki korzenia włóknikowego bądź epidermy korzenia. Na tym etapie po raz pierwszy możliwy jest kontakt wirusa z komórką gospodarza. Po zasiedleniu komórek korzenia przez wektor formowane są nieregularne skupiska cyst zwane plazmodiami, przekształcające się w kolejnych etapach w zoosporangia bądź też w skupiska sporoczynkowych (cystosorusy) (Ryc. 1). W ciągu kilku dni, przy sprzyjających warunkach, zoosporangia dają początek wolnym wtórnym zoosporom, wyprowadzanym na zewnątrz i zdolnym do zasiedlania kolejnych partii korzeni (KESKIN 1964). Wirus namna-



Ryc. 1. Cystosorusy *Polymyxa betae* w korzeniu odmiany standardowej buraka cukrowego, nie posiadającej odporności na rizomanię.

Struktury te występują szczególnie obficie w korzeniach włósnikowych oraz w części wierzchołkowej korzenia głównego (fot. Maria Goška).

za się w komórkach roślinnych, a następnie podlega akumulacji w plazmodiach wektora (ABE i TAMADA 1986, RYSANEK i współaut. 1992). W początkowych stadiach cyklu rozwojowego wektora produkowane są głównie zoospory, natomiast w późniejszych etapach dominują spory spoczynkowe, które, wraz z postępującym uszkodzeniem korzeni, rozprzestrzeniają się w glebie. Tam, w odpowiednich warunkach termiczno-wilgotnościowych, z cystosorusów wytwarzane są kolejne generacje pierwotnych zoospor. Powtarzające się etapy zasiedlania i uwalniania wektora sprzyjają jego namnażaniu oraz zwiększają częstotliwość kontaktu wirusa z gospodarzem (SCHOLTEN i LANGE 2000, LENNEFORS 2006, RUSH i współaut. 2006).

Na skutek porażenia roślin podatnych na wirusa dochodzi do wytworzenia obfitego systemu drobnych korzeni włósnikowych wraz z pojawieniem się w miejscach ich intensywnego rozwoju tumorowatych narośli, a jednocześnie następuje zahamowanie wzrostu korzenia głównego, brązowienie wiązek przewodzących w wyniku ich nekrotyzacji, co jest szczególnie widoczne na szczycie korzenia głównego, oraz, ostatecznie, rozwój martwicy tkanki korzenia, obejmującej korzenie boczne i korzeń główny. W tej sytuacji niedostateczny pobór wody i składników odżywczych przyczynia się do występowania chlorozy, przewężenia i pokarbowania blaszek liściowych, utraty turgoru, rzadziej nato-

miast, szczególnie przy silnych opadach deszczu w połączeniu z wysokimi temperaturami, obserwuje się systemiczne rozprzestrzenianie się wirusa i żółknięcie nerwów liściowych (SCHOLTEN i LANGE 2000, RUSH i współaut. 2006, DE BIAGGI i współaut. 2010).

Na podstawie różnic na poziomie genomu, zidentyfikowanych poprzez analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych oraz polimorfizmu konformacji pojedynczych nici, wyodrębniono trzy główne typy wirusa BNYVV: A, B i P (KRUSE i współaut. 1994; KOENIG i współaut. 1995, 1997). Jednocześnie zaobserwowano pewne zróżnicowanie w obrębie grupy wirusów posiadających RNA5, tj. typu P pochodzącego z Europy i izolatów z Azji, w związku z czym pojawiły się sugestie dotyczące wyodrębnienia kolejnego typu J (KOENIG i współaut. 1997, SCHIRMER i współaut. 2005). Ponadto, inne odglebowe wirusy buraka cukrowego, w tym: odglebowy wirus buraka (ang. Beet soil-borne virus, BSBV), wirus Q buraka (ang. Beet virus Q, BVQ) oraz odglebowy wirus mozaiki buraka (ang. Beet soil-borne mosaic virus, BSBMV) są przenoszone przez tego samego wektora. BNYVV, BSBV oraz BVQ, również na terenie Polski, występują najczęściej w swoistym kompleksie, stąd też coraz częściej mówi się o występowaniu objawów „rizomaniopodobnych” (MEUNIER i współaut. 2003, BORODYNKO i POSPIESZNY 2007) (Ryc.2). Wydaje się, że mechanizmy odporności na wymienione wirusy mogą w znacznej mierze pokrywać się w przypadku niektórych źródeł odporności. Gen *Rz1*, jedno z głównych źródeł odporności na BNYVV, najprawdopodobniej nie nadaje odporności na BSBV (LENNEFORS 2006). Z jednej strony istnieje przekonanie, że wirus ten ma mniejsze znaczenie dla strat plonu oraz że infekcja nim przebiega asymptotycznie, z drugiej strony natomiast, doświadczenia szklarniowe prowadzone w Niemczech sugerują znaczące straty plonu (LENNEFORS 2006, BORODYNKO i POSPIESZNY 2007). Różnice te mogą wynikać z innego rodzaju odporności występującej w danym materiale roślinnym. W toku badań polowych poświęconych oddziaływaniu BSBV na plon oraz zawartość cukru odmian wrażliwych i tolerancyjnych buraka cukrowego stwierdzono brak typowych dla rizomanii objawów chorobowych oraz dowiedziono, że wirus ten nie powodował znaczących strat plonu, a jego zawartość w odmianach tolerancyjnych na BNYVV była wyraźnie ograniczona. Wydaje się zatem, że w przetestowa-

nych odmianach mechanizmy odporności na BNYVV oraz BSBV mogą być zbieżne (BORODYNKO i współaut. 2009).

Odporność na BNYVV jest utrzymywana, mimo obecności BSBV i BVQ, również w roślinach transgenicznych (LENNEFORS 2006). Ponadto istnieją doniesienia o możliwości nabycia przez roślinę krzyżowej odporności, przykładowo, na BNYVV poprzez wcześniejszą inokulację wirusem BSBMV bądź odwrotnie (MAHMOOD i RUSH 1999). Natomiast wyniki doświadczeń, w których badano mieszaną infekcję wirusami BNYVV oraz BSBMV wskazują, że gen *Rz* nie nadaje odporności na BSBMV, ale BNYVV może ograniczać rozwój BSBMV, nawet w odmianach tolerancyjnych na rizomanię. Jednocześnie nie zaobserwowano jednoznacznego wpływu infekcji mieszanej na porażenie BNYVV w stosunku do występowania tego wirusa pojedynczo, chociaż wydaje się, że omawiane wirusy od-

działają na siebie antagonistycznie (WISLER i współaut. 2003). Również niektóre izolaty *P. betae* mogą znacząco przyczyniać się do ograniczenia wzrostu korzeni buraka (WISLER i współaut. 2003, LENNEFORS 2006).

Z drugiej strony, występowanie tzw. „brody korzeniowej” wskutek nadmiernej proliferacji korzeni bocznych często jest rezultatem ataku innych patogenów, a nawet oddziaływania czynników abiotycznych. Podobne objawy w tkance korzenia obserwowane są przykładowo w wyniku infekcji BBSV, który został zidentyfikowany w USA (ang. Beet black scorch virus) (WEILAND i współaut. 2006).

Dla dokładnego poznania i zrozumienia interakcji pomiędzy różnymi wirusami przenoszonymi przez *P. betae* oraz innymi patogenami konieczne wydaje się porównanie tych oddziaływań na tle różnych źródeł odporności na rizomanię.

ŹRÓDŁA ODPORNOŚCI NA RIZOMANIĘ

Pierwotnie głównym celem hodowli buraka cukrowego, zapoczątkowanej w Europie Północnej, było zwiększenie zawartości oraz poprawa ekstrakcji cukru, natomiast hodowla odpornościowa nie odgrywała znaczącej roli. Z czasem, istotnymi trendami hodowli stały się również jednonasiennosc oraz wykorzystanie systemu cytoplazmatycznej męskiej sterylności. Kierunki te przyczyniły się do znaczącego zawężenia puli genowej materiałów wyjściowych oraz form uprawnych tego gatunku, podczas gdy wiele cennych genów odporności pozostaje wciąż wśród form dzikich buraka, stąd też zasoby te od początków XX w. zaczęto również wykorzystywać w programach hodowlanych (SZOTA 1997, PANELLA i LEWELLEN 2007). Ponadto, wraz z rozszerzaniem się obszarów produkcji, koniecznością stało się poszukiwanie genów zapewniających dobre plonowanie i uprawę w warunkach występowania różnych chorób i szkodników buraka cukrowego.

Do materiałów źródłowych determinujących podwyższoną odporność/tolerancję na działanie BNYVV zaliczyć można nie tylko obiekty buraka cukrowego zaadaptowane i uzyskane w toku procesów hodowlanych, podlegające uprzednio selekcji (np. Holly-1-4), ale również te reprezentujące formy dzikie z rodzaju *Beta* (np. WB42, WB41) (SCHOLTEN i LANGE 2000, RUSH i współaut. 2006, DE BIAGGI i współaut. 2010). Odpor-

ność zidentyfikowana w wartościowych obiektach hodowlanych najprawdopodobniej wywodzi się także od ich odległych dzikich przodków (BIANCARDI i współaut. 2002, DE BIAGGI i współaut. 2010). Identyfikacja kolejnych loci związanych z odpornością, pochodzących z różnych źródeł, umożliwiła komercyjnie ich zastosowanie poprzez wprowadzenie do odmian uprawnych, które, dzięki temu, mogą już posiadać cechę uwarunkowaną wielogenowo (GIDNER i współaut. 2005, RUSH i współaut. 2006, LIU i LEWELLEN 2007, DE TEMMERMAN i współaut. 2009). Natomiast opisy potencjalnie przydatnych obiektów dokonane na podstawie uprzedniej ewaluacji dostępne są w bazach danych, jak np. Międzynarodowa Baza Danych dla Beta (IDBB), co ułatwia wstępny dobór materiałów (PANELLA i LEWELLEN 2007). Obecnie możliwe jest ponadto uzyskiwanie transgenicznych roślin odpornych (LENNEFORS 2006).

Występowanie rizomanii odnotowano po raz pierwszy we Włoszech w 1952 r. i tam też później zainicjowane zostało poszukiwanie źródeł odporności przez firmę nasienną Maribo. Z materiałów pochodzenia włoskiego, selekcionowanych pod kątem odporności na *Cercospora beticola*, wyprowadzono pierwsze linie posiadające pewien stopień odporności (SCHOLTEN i LANGE 2000, BIANCARDI i współaut. 2002). Jednymi z pierwszych odmian posiadających tolerancję na

rizomanię i bazujących na materiałach tego pochodzenia, były wielonasienna diploidalna odmiana Alba P (Alba), posiadająca odporność uwarunkowaną wielogenowo oraz jednonasienna diploidalna odmiana Rizor (SES) (DE BIAGGI i współaut. 2010). W toku dalszych prac wyhodowano ulepszone mieszańce, jak np. Rizor 3, w oparciu o udoskonalone zapylacze. Odmiana Rizor, stworzona na bazie podatnej linii CMS, została pierwotnie opisana jako prezentująca odporność jednogenną typu dominującego. Wkrótce jednak utrwalenie odporności w formie homozygotycznej okazało się trudne. Segregacje potomstwa odbiegały od modelu przyjętego dla jednogennej cechy dominującej i zaczęto rozważać możliwość obecności dodatkowych genów regulujących ekspresję (BIANCARDI i współaut. 2002).

Kolejne materiały uzyskano w toku programu przeszukiwania zasobów prowadzonego w USA w odpowiedzi na rozprzestrzenianie się tam choroby. Odporność, występująca w materiałach pochodzących z firmy Holly Hybrids (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*), została po raz pierwszy odkryta w 1983 r. przez Erichsena w trzech eksperymentalnych mieszańcach bazujących na jednym komponentie CMS, który okazał się być źródłem odporności (LEWELLEN i współaut. 1987). Zasugerowano jednocześnie, że cecha jest najprawdopodobniej uwarunkowana jednogennowo, dzięki obecności genu *Rz*, później oznaczonego jako *Rz1* (LEWELLEN i współaut. 1987, SCHOLTEN i współaut. 1996). Na podstawie koncentracji wirusa w osobnikach pokolenia F1 uzyskanego z krzyżowania homozygot odpornych z roślinami podatnymi dowiedziano, że odporność dziedziczy się w sposób dominujący (SCHOLTEN i współaut. 1996). Ten gen znalazł następnie szerokie zastosowanie w hodowli i został wprowadzony do wielu komercyjnych odmian (BIANCARDI i współaut. 2002, DE BIAGGI i współaut. 2010). Jednocześnie stwierdzono różny stopień podatności występujący w innych materiałach hodowlanych. Podobny poziom odporności, jak w przypadku obecności *Rz1*, odnotowano przykładowo w liniach hodowlanych C39R oraz C47R, otrzymanych w toku kolejnych cykli selekcji fenotypowej, jednak w materiałach tych pożądana cecha była uwarunkowana w sposób ilościowy, w związku z czym trudniejsze okazało się jej zastosowanie w programach hodowlanych (RUSH i współaut. 2006). Obserwacje wpływu występowania *Rz1* w diploidalnych i triploidalnych

materiałach oraz rozszczepienia uzyskane w pewnych populacjach segregujących wskazują jednak na możliwość niepełnej dominacji tego allelu i/lub różny stopień penetracji genu bądź też oddziaływanie genów epistatycznych (PELSY i MERDINGLOU 1996, GIORIO i współaut. 1997, SCHOLTEN i współaut. 1997, WISLER i współaut. 1999, LEIN i współaut. 2006). Z drugiej strony, w toku kolejnych doświadczeń wykazano zbliżony poziom tolerancji na BNYVV zarówno u homozygot dominujących, jak i u heterozygot pod względem *Rz1* (NOUHI i współaut. 2009). Trudno jednoznacznie wskazać przyczyny tych różnic, ale mogą one wynikać przykładowo z nieporównywalnych warunków eksperymentalnych poszczególnych doświadczeń (różnice w koncentracji wirusa w glebie i potencjale jego inokulum, co może wpływać na załamywanie odporności), z różnej dokładności odczytów testu ELISA oraz różnej ilości powtórzeń tego testu na poszczególnych genotypach, z odmiennego stadium roślin w momencie ich porażania bądź też ze specyfiki samych populacji segregujących. Poza tym istotny wydaje się fakt, iż zidentyfikowane zostały pewne analogi genów odporności RGA (ang. resistance gene analogues) na chromosomie III, związane z *Rz1* (HUNGER i współaut. 2003, LEIN i współaut. 2006). Dla niektórych RGA nie stwierdzono jednak współsegregacji z tym genem (HUNGER i współaut. 2003), inne RGA zostały natomiast opisane jako blisko związane, a nawet segregujące z *Rz1* (LEIN i współaut. 2006). Przykładowo, allel określony mianem *Rz-C* znalazł zastosowanie w odróżnianiu odmian podatnych i odpornych, a jego transkrypt był wykrywany we wszystkich materiałach odpornych poddanych analizom (LEIN i współaut. 2006). Mogłoby to sugerować udział dodatkowych genów o mniejszym znaczeniu, potencjalnie warunkujących specyfikę reakcji odporności w danej linii bądź też stanowiących rezerwuar zmienności genetycznej dla nowych genów odporności (MICHELMORE i MEYERS 1998). LEIN i współaut. (2006) uważają, że *Rz1* mieści się pomiędzy dwoma skupiskami analogów genów odporności i w związku z tym opisują uwarunkowanie dziedziczenia odporności na rizomanię terminem locus cechy ilościowej QTL (ang. quantitative trait locus), a mianowicie *Rz1*-QTL. Podobne określenie zostało wykorzystane już wcześniej do opisu sekwencji DNA zlokalizowanej pomiędzy dwoma markerami na obszarze 4,6 cM, decydującej o ponad 67%

obserwowanej zmienności fenotypowej oraz prawie całej zmienności genetycznej, uznanej zatem za odpowiadającą *Rz1*. Stwierdzono wówczas, że zmienność cechy warunkowanej tym genem jest wynikiem jego ekspresji w danych warunkach środowiskowych, czyli penetracji. Jednocześnie zidentyfikowano markery RAPD związane w istotny statystycznie sposób z poziomem odporności na rizoanię (PELSY i MERDINOGLU 1996). Dalsze badania wydają się wciąż jednak niezbędne dla wyjaśnienia roli genów modulujących, które mogą modyfikować odporność bazującą na *Rz1* (DE BIAGGI i współaut. 2010).

R104 jest innym obiektem *B. vulgaris* ssp. *vulgaris*, w którym również stwierdzono obecność głównego dominującego genu odporności, najprawdopodobniej identycznego z *Rz1* (SCHOLTEN i współaut. 1997, 1999). Linia ta wywodzi się z jednorocznej formy dzikiego buraka pochodzenia włoskiego (SCHOLTEN i współaut. 1997). Analogicznie, odporność w obiekcie R128 wywodzącym się najprawdopodobniej z Turcji, z formy buraka liściowego, jest również ściśle związana z *Rz* (SCHOLTEN i współaut. 1997). Pomimo braku kompletnej informacji dotyczącej genealogii pierwszych materiałów wykazujących odporność, molekularne analizy różnych genotypów wskazują na możliwość występowania ich wspólnego przodka. Istnieją sugestie, że mógłby nim być jakiś burak nadmorski. Jednak, ze względu na intensywną wymianę materiałów hodowlanych, jaka miała miejsce w latach 60 XX w. między Europą i USA, ostateczna weryfikacja tej hipotezy jest bardzo trudna (BIANCARDI i współaut. 2002). *Rz1* wywodzi się najprawdopodobniej z zasobów genetycznych buraków nadmorskich należących do puli Munerati, które to źródło przypuszczalnie stanowiło podstawę do uzyskania odporności typu 'Alba', 'Rizor' oraz 'Holly'. Geny odporności typu 'Rizor' i 'Holly' zostały zmapowane bardzo blisko siebie (DE BIAGGI i współaut. 2010). Badania przeprowadzone z pomocą markerów molekularnych wykazały m.in. obecność pewnych wspólnych sekwencji w tym samym regionie chromosomalnym, związanych z odpornością w materiałach typu 'Holly' oraz liniach wywodzących się z odmian Rizor oraz Golf, jak również w materiałach pochodzących od *B. maritima*, a także od innych buraków dzikich (BARZEN i współaut. 1997, GIORIO i współaut. 1997, SCHOLTEN i współaut. 1997). Stwierdzono mianowicie obecność markera SCAR F6, którego odległość od genu *Rz* została oszacowa-

wana na około 1,3 cM oraz brak fragmentu SCAR N9 występującego u roślin podatnych. Ten zestaw markerów SCAR sugeruje jednorodność źródeł typu 'Holly' i 'Rizor'. Ponadto dzięki zastosowaniu w/w markerów dokonano odróżnienia heterozygot od homozygot pod względem genu *Rz* w populacjach segregujących w źródle odporności typu 'Holly' (BARZEN i współaut. 1997). Analogiczny system markerów znalazł również zastosowanie w ocenie populacji wywodzącej się z odmiany Golf, co potwierdziło możliwość wspólnego źródła odporności w stosunku do 'Holly', chociaż jednocześnie występowały pewne różnice. Mianowicie, nie zaobserwowano identycznego układu markerów F6 i N9, co nie pozwoliło na jednoznaczne wykluczenie udziału innych genów zlokalizowanych w podobnym obszarze genomu, jednak warunkujących nieco odmienne typy odporności (GIORIO i współaut. 1997). W populacji wywodzącej się od Holly-1-4 opisano z kolei bardziej oddalone markery pozwalające na odróżnienie homozygot od heterozygot pod względem *Rz1* (NOUHI i współaut. 2008). Natomiast SCHOLTEN i współaut. (1997) zidentyfikowali markery RAPD związane z loci odporności dla populacji segregujących Holly-1-4, R104, R128 oraz WB42, przy czym nie stwierdzono obecności markerów wspólnych dla wszystkich wymienionych obiektów. Pojawiały się natomiast produkty specyficzne jedynie dla części bądź nawet poszczególnych badanych materiałów. Przykładowo, zastosowanie startera OP-01 pozwoliło na odróżnienie sekwencji wspólnych dla Holly-1-4, R104 i R128, podczas gdy inne markery były najsilniej związane z odpornością w przypadku WB42 (SCHOLTEN i współaut. 1997). Potwierdza to zatem obecność pewnych wspólnych elementów decydujących o dziedziczeniu odporności w niektórych materiałach pochodzących z odrębnych źródeł, ale jednocześnie może wskazywać na występowanie różnic między nimi, takich jak udział innych loci w przypadku WB42 w stosunku do Holly-1-4. Bazując wyłącznie na markerach molekularnych związanych z locus danego genu, ale nie należących do jego sekwencji, nie można jednak z całą pewnością wykluczyć, że, pomimo obecności wspólnego źródła odporności, w rozwoju filogenetycznym poszczególnych obiektów nie doszło do rozzerwania sprzężenia sekwencji markerowych z tym genem.

Wspomniany obiekt WB42 należy do dzikich gatunków z rodzaju *Beta*, stanowiących

rezerwuar atrakcyjnych genów odporności na różne choroby i szkodniki buraka. Wśród gatunków tych na szczególną uwagę zasługuje *B. vulgaris* ssp. *maritima* ze względu na bliskie pokrewieństwo z burakiem uprawnym i, co się z tym wiąże, kompatybilność krzyżowania (SCHOLTEN i LANGE 2000, PANELLA i LEWELLEN 2007). W celu przeniesienia korzystnych właściwości z tego gatunku stosowano dwa główne podejścia: bazujące na selekcji indywidualnych obiektów bądź też na złożonych kolekcjach materiałów (RUSH i współaut. 2006, PANELLA i LEWELLEN 2007).

W pierwszym przypadku, po zidentyfikowaniu odporności w obrębie określonego obiektu, dokonywano krzyżowań wstecznych (ang. backcross) do linii hodowlanych buraka cukrowego. W ten właśnie sposób wprowadzono geny pochodzące z *B. vulgaris* ssp. *maritima* WB42 do buraka cukrowego (LEWELLEN i WHITNEY 1993, RUSH i współaut. 2006). Na podstawie segregacji potomstwa uzyskanego z krzyżowań pomiędzy WB42 oraz Holly-1-4 stwierdzono, że gen odporności w WB42 jest usytuowany w odrębnym, blisko położonym locus w stosunku do *Rz1*, stąd został on oznaczony jako *Rz2*. Odległość między tymi genami oszacowano w przybliżeniu na 20 cM. Jednocześnie nie wykluczono udziału dodatkowych genów niosących odporność oraz zaobserwowano, że koncentracja wirusa w testach szklarniowych była niższa w przypadku WB42 w porównaniu z Holly-1-4 oraz R104 (SCHOLTEN i współaut. 1994, 1999). Wykazano ponadto większą podatność na infekcję genotypów *Rz1rz1* w porównaniu z *Rz2rz2*, podczas gdy odmiana Angelina łącząca *Rz1rz1* z *Rz2rz2* była najbardziej odporna (LIU i LEWELLEN 2007). Kolejne doniesienia wydają się potwierdzać, że WB42 warunkuje wyższy poziom odporności oraz że odporność tego rodzaju podlega kontroli pojedynczego genu dominującego, którego odległość w stosunku do *Rz1* (35 cM) została ustalona na podstawie frekwencji rekombinantów posiadających konkretne markery molekularne i dla którego opracowano najbliżej dotychczas położony marker związany z allelem recesywnym. Poprzez zestawienie wartości uzyskanych w teście ELISA oraz segregacji tego markera stwierdzono, że podobny stopień tolerancji występuje w homozygotach dominujących jak w przypadku heterozygot (AMIRI i współaut. 2003, 2009). W pracach badawczych, w których oceniano odległość między *Rz1* a *Rz2* w oparciu o jakościową klasyfikację fenotypu (rośliny po-

datne vs. odporne), nie można jednak jednoznacznie wykluczyć przeszacowania frekwencji rekombinacji (GIDNER i współaut. 2005). Zmienność stopnia odporności w różnych kombinacjach mieszańców posiadających *Rz2* sugeruje z kolei możliwość epistatycznego oddziaływania z genami o mniejszym znaczeniu (MEULEMANS i współaut. 2003).

W innym, atrakcyjnym obiekcie *B. vulgaris* ssp. *maritima* WB41 opisano natomiast trzeci ze znanych genów odporności, a mianowicie *Rz3*. Znajduje się on w sąsiedztwie *Rz1* i *Rz2*, na chromosomie III, w odległości oszacowanej na 5 cM od *Rz1*. Obserwacje heterozygot wskazują, iż omawiany gen może cechować się niekompletną penetracją. Jednocześnie w źródle WB41 nie wykluczono udziału dodatkowych genów warunkujących odporność oraz stwierdzono konieczność dalszej jednoznacznej weryfikacji odrębności genów *Rz2* i *Rz3* (GIDNER i współaut. 2005). Dokonano już przeniesienia wymienionych genów do materiałów hodowlanych, takich jak linia C48, łącząca w sobie źródła WB41/WB42, czy do linii C79-3 oraz C79-2 (LEWELLEN i WHITNEY 1993, RUSH i współaut. 2006, PANELLA i LEWELLEN 2007).

Wydaje się, że odporność w materiałach *B. vulgaris* ssp. *maritima*, podobnie jak w przypadku źródła „Holly”, podlega kontroli pojedynczego genu dominującego, chociaż dokładne uwarunkowania jej dziedziczenia oraz molekularne mechanizmy nie zostały dotychczas jednoznacznie opisane (LEIN i współaut. 2006, TAMADA 2007). Warto zaznaczyć, że pomimo hipotezy o wspólnym pochodzeniu materiałów prezentujących różne typy odporności, analizy molekularne przeprowadzone na obiektach Holly-1-4 oraz WB42 nie wskazują na obecność wspólnych markerów związanych z fenotypem (SCHOLTEN i współaut. 1997, NOUHI i współaut. 2008, AMIRI i współaut. 2009). W toku innych prac badawczych wykazano jednak obecność charakterystycznych dla odporności produktów, jak Rz-C, w różnych odmianach odpornych, niezależnie od występującego w nich układu genów, tj. obecności *Rz1*, *Rz2*, bądź też obu tych genów równocześnie. Najprawdopodobniej fragment Rz-C koduje białko zawierające w swej strukturze miejsce wiązania nukleotydów NBS (ang. nucleotide-binding site) oraz domenę bogatą w elementy leucynowe LRR (ang. leucine-rich repeats), które mogą być niezbędne dla zainicjowania odpowiedzi nadwrażliwości i śmierci komórki w miejscu infekcji (LEIN i współaut.

2006). Zatem, powszechne występowanie niektórych genów, takich jak analogi genów odporności może odzwierciedlać pewne uniwersalne mechanizmy leżące u jej podstaw. Jednocześnie istnieją doniesienia wskazujące, że współwystępowanie *Rz1* i *Rz3* uzyskane w wyniku odpowiednich krzyżowań może wzmacniać odporność roślin na wirusa oraz że rośliny posiadające *Rz2* charakteryzują się większą tolerancją w porównaniu z innymi, zawierającymi jedynie *Rz1* (PAUL i współaut. 1993, SCHOLTEN i współaut. 1999, AMIRI i współaut. 2003, GIDNER i współaut. 2005), co z kolei sugeruje, że odrębne i niezależne lub częściowo uzupełniające się elementy genetyczne uczestniczą w regulacji bardziej wyspecjalizowanych mechanizmów odporności. Presja selekcyjna patogena na geny rośliny-gospodarza w warunkach populacji naturalnych może znacząco odbiegać od analogicznych oddziaływań w środowisku roślin uprawnych, co z pewnością nie pozostaje bez wpływu na tempo mutacji oraz w konsekwencji na ewolucję różnych typów odporności.

Inne podejście związane z przeniesieniem genów z gatunków dzikich polega na ocenie całych kolekcji pod kątem odporności na rizomanię, po czym wybrane obiekty są włączane do jednego programu hodowlanego, niejednokrotnie bez określania czynników sprawczych, tj. wyodrębniania konkretnych genów (RUSH i współaut. 2006, PANELLA i LEWELLEN 2007). Równoległe wciąż prowadzone są prace związane z identyfikacją czynników determinujących korzystne właściwości dzikich form buraka. Przykładowo, w populacji mapującej R36, wywodzącej się z materiałów uzyskanych w toku złożonego krzyżowania około 60 obiektów *B. vulgaris* ssp. *maritima* z burakiem cukrowym, zidentyfikowano QTL posiadający główny wpływ na odporność w stosunku do BNYVV, opisany jako *Rz4*. Został on zmapowany na chromosomie III, podobnie jak wszystkie uprzednio poznane loci *Rz*, i podobnie jak one jest odpowiedzialny za częściową odporność (GRIMMER i współaut. 2007). Jednocześnie, właściwe testy alleliczności wydają się konieczne dla zweryfikowania odrębności/tożsamości genów *Rz1*, *Rz2*, *Rz3* i *Rz4*. Dzięki takim testom ustalono przykładowo, że odporność w obiektach Holly-1-4 oraz WB42 jest warunkowana przez niealleliczne, ale związane ze sobą loci (SCHOLTEN i współaut. 1999, AMIRI i współaut. 2003). Wśród innych zidentyfikowanych dotychczas źródeł odporności wy-

różnić można również: C28, R04, R05, C50, WB151, WB169 i WB258 (LENNEFORS 2006, GRIMMER i współaut. 2008). W większości przypadków odporność pochodząca z tych obiektów nie została jak dotąd w pełni scharakteryzowana pod względem genetycznym, a pojedyncze przeprowadzone doświadczenia mapowania wskazują, że może być ona determinowana przez czynniki alleliczne w stosunku do opisanych uprzednio genów. GRIMMER i współaut. (2008) określili na chromosomie III pozycję *Rz5*, czyli genu głównego wywodzącego się ze źródła 'WB258' oraz zasugerowali, że wraz z *Rz4* i *Rz1* geny te stanowią prawdopodobnie serię alleli.

Odporność na BNYVV została również opisana dla innych, dzikich gatunków z rodzaju *Beta*, m.in. *B. patellaris*, *B. procumbens* oraz dla wybranych obiektów *B. corolliflora*, *B. macrorrhiza*, *B. lomatogona*, czy też *B. intermedia* (LUTERBACHER i współaut. 2005).

Odrębnym kierunkiem hodowli odpornościowej może być poszukiwanie materiałów wyróżniających się odpornością na *P. betae*. Częściowa tolerancja na wektor została stwierdzona dla *B. maritima*, natomiast kompletna dla buraków z sekcji *Procumbentes*: *B. patellaris*, *B. procumbens* i *B. webbiana* (BARR i współaut. 1995, MESBAH i współaut. 1997, SCHOLTEN i LANGE 2000, KINGSNORTH i współaut. 2003, ASHER i współaut. 2009). Obiekty należące do gatunków *B. corolliflora*, *B. intermedia*, *B. trygina*, *B. lomatogona* oraz *B. macrorrhiza* z sekcji *Corollinae* również wykazywały odporność (SCHOLTEN i LANGE 2000). Chociaż bariery krzyżowalności ograniczają potencjalne praktyczne wykorzystanie większości wymienionych gatunków w tradycyjnej hodowli, klonowanie genów może stać się narzędziem ułatwiającym ich wprowadzenie (SZOTA 1997, SCHOLTEN i LANGE 2000). Kombinacja odporności na wirus i wektor jednocześnie może znacząco obniżać ilość wirusa w roślinie (MESBAH i współaut. 1997, ASHER i współaut. 2009). Z drugiej strony, przeniesieniu poprzez krzyżowania korzystnych cech z form dzikich rodzaju *Beta* towarzyszy najczęściej introgresja pewnych niepożądanych właściwości, jakimi są: niska koncentracja i ekstrakcyjność sacharozy, jednoroczność, obecność czerwonego pigmentu w korzeniu oraz jego nietypowy kształt. Wymaga to prowadzenia dodatkowych krzyżowań wypierających (PANELLA i LEWELLEN 2007).

Innym rozwiązaniem zapewniającym odporność może być bezpośrednie przeniesie-

nie pewnych genów wirusowych na drodze transformacji genetycznej, np. genów białka płaszczka, replikazy czy też genu kodującego białko decydujące o przemieszczaniu się wirusa (EHLERS i współaut. 1991, SCHOLTEN i LANGE 2000, LENNEFORS i współaut. 2006). Najczęściej wykorzystywanymi strategiami dla buraka cukrowego wydają się dwa pierwsze z wymienionych zastosowań. W szczególności natomiast zestawienie odporności transgenicznej z naturalnie występującymi źródłami skutkuje bardziej skuteczną ochroną w warunkach silnego porażenia (MANNERLÖF i współaut. 1996, SCHOLTEN i LANGE 2000, LENNEFORS i współaut. 2006). Ekspresja genu pochodzącego od wirusa może, zgodnie z koncepcją odporności pochodzącej od patogena (SANFORD i JOHNSTON 1985), powodować zakłócenia w jego prawidłowym rozwoju, np. na drodze posttranskrypcyjnego wyciszenia RNA. Mechanizm ten stwierdzono przykładowo w transgenicznym buraku z fragmentem replikazy wstawionym w orientacji odwróconej, w których odnotowano bardzo małe ilości mRNA transgenu, a jednocześnie znaczący poziom odpowiadającego mu siRNA w korzeniach (LENNEFORS i współaut. 2006). Transgeniczna odporność tego typu prezentowała się bardzo korzystnie w porównaniu do źródeł konwencjonalnych, także w warunkach porażenia szczególnie wirulentnym typem P BNYVV oraz izolatem

pochodzącym z USA (ang. Imperial Valley, IV-BNYVV), przełamującym odporność bazującą na *Rz1* (LENNEFORS 2006). Ponadto, w przeciwieństwie do odporności typu „Holly”, znaczący poziom odporności transgenicznych hemizygot wskazywał na model pełnej dominacji (LENNEFORS i współaut. 2006).

Obecnie dokonano już znaczącego postępu w hodowli odmian odpornych na rizożnię w porównaniu do odmian pierwszej generacji, które w warunkach braku porażenia wykazywały wyraźnie niższe plony w stosunku do odmian nieodpornych (SCHOLTEN i LANGE 2000, BIANCARDI i współaut. 2002, GIDNER i współaut. 2005, DE BIAGGI i współaut. 2010). Jednocześnie, doświadczenia szklarniowe dotyczące stopnia porażenia wirusem wskazują, że odmiany kolejnych generacji są bardziej wyrównane w kontekście odpowiadzi na wirus (SCHOLTEN i LANGE 2000). Uprawa takich odmian może ograniczać tempo namnażania się wirusa i rozprzestrzeniania choroby. Jednakże, w przypadku odmian bazujących na jednym typie odporności, jak przykładowo „Holly”, które to źródło wciąż jest powszechnie stosowane, istnieje podwyższone ryzyko załamania się odporności (LENNEFORS 2006, DE BIAGGI i współaut. 2010). Dlatego też w najnowszych odmianach wykorzystuje się kombinację różnych źródeł odporności (BIANCARDI i współaut. 2002, DE BIAGGI i współaut. 2010).

PRZELAMYWANIE ODPORNOŚCI PRZEZ WIRUS

Ze względu na pojawianie się nowych szczepów wirusa, wykazujących zdolność do przełamania dotychczasowej częściowej odporności, wciąż aktualne wydaje się poszukiwanie nowych jej źródeł. Identyfikacja kolejnych związanych z odpornością loci pozwala na wytwarzanie odmian łączących różne jej typy, oparte na odmiennych mechanizmach. W trakcie tego procesu wykorzystuje się markery molekularne umożliwiające selekcję materiałów wyjściowych i dobór komponentów rodzicielskich posiadających odpowiednie geny odporności w stanie homozygotycznym, co zapewnia skrócenie czasu niezbędnego dla wytworzenia nowej odmiany (SCHOLTEN i współaut. 1999, DE BIAGGI i współaut. 2010). Z drugiej strony natomiast, długotrwała uprawa roślin posiadających odporność jednego rodzaju może sprzyjać ewolucji nowych form patogena poprzez zwiększoną presję selekcyjną. Świadczą o tym ob-

serwacje dokonane w dolinie Imperial Valley w USA, gdzie przez dłuższy czas ze względu na powszechne występowanie BNYVV uprawiano odmiany z odpornością warunkowaną przez *Rz1* i gdzie następnie odnotowano pojawianie się nowych szczepów wirusa, zdolnych do przełamania tego źródła odporności (RUSH i współaut. 2006, PANELLA i LEWELLEN 2007). Potwierdzają to spostrzeżenia LIU i współaut. (2005) wskazujące na znaczące podobieństwo szczególnie zjadliwych izolatów IV-BNYVV do znanego już typu A izolatów tego wirusa. Ponadto, porównywalną zdolność do przełamania odporności bazującej na *Rz1* stwierdzono w Hiszpanii dla BNYVV typu A, co sugeruje funkcjonowanie analogicznych mechanizmów w przypadku geograficznie niezależnych zdarzeń selekcyjnych (PFERDMENGES i współaut. 2009). W populacjach BNYVV poddanych presji selekcyjnej związanej z oddziaływaniem źródła od-

porności *Rz1* stwierdzono zmiany struktury genetycznej polegające na selekcji wariantów wirusa najbardziej zdolnych do pokonywania bariery odporności (ACOSTA-LEAL i współaut. 2008). O znaczącym zróżnicowaniu w populacji wirusa zdolnej do pokonywania odporności, ale pochodzącej z jednego pola świadczyć może również szeroki zakres objawów indukowanych wskutek mechanicznej inokulacji roślin (LIU i współaut. 2005). Wśród innych znanych izolatów o znaczącej agresywności na uwagę zasługują te zawierające RNA 5, w szczególności zaś pochodzące z Azji oraz reprezentujące typ P występujący we Francji, w Wielkiej Brytanii i Kazachstanie (SCHIRMER i współaut. 2005).

Z drugiej strony, obecność dodatkowych alleli warunkujących odporność, np. *Rz2* może nadać częściową odporność na te szczepy wirusa, co stwierdzono np. w przypadku oddziaływania izolatów IV-BNYVV na odmianę Angelina, posiadającą zarówno *Rz1*, jak i *Rz2* (LIU i współaut. 2005, LIU i LEWEL-

LEN 2007). Stąd też jedynym rozwiązaniem wydaje się uprawa odmian bazujących na różnorodnych źródłach odporności, najlepiej dostosowanych do warunków lokalnych. Ponadto, zastosowanie strategii uprawy na jednym polu odmian zróżnicowanych pod względem genetycznej determinanty odporności, mogłoby w znaczącym stopniu przyczynić się do osłabienia populacji wirusa oraz ograniczyć zjawisko wyodrębniania się szczególnie wirulentnych podtypów (ACOSTA-LEAL i współaut. 2008).

Badania wykazują jednak, że nie bez znaczenia dla przełamania odporności mogą być również inne, pozagenetyczne czynniki, takie jak ilość wirusa w glebie oraz pozostałe warunki środowiska glebowego, zwłaszcza temperatura i wilgotność, czy też interakcje z innymi patogenami, stadium rozwoju rośliny w momencie kontaktu z patogenem oraz jej fizjologiczna kondycja (RUSH i współaut. 2006, LENNEFORS 2006).

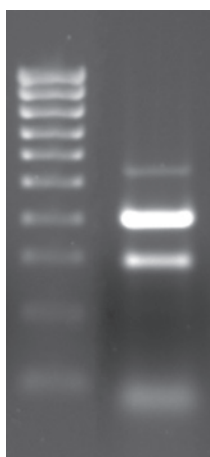
MOŻLIWE MECHANIZMY ODPORNOŚCI

Istnieją różne potencjalne możliwości funkcjonowania mechanizmów odporności. Z jednej strony, mogą one dotyczyć odporności na wektor *P. betae*, z drugiej strony zaś, na wirus BNYVV (SCHOLTEN i LANGE 2000).

W przypadku odporności na wektor zidentyfikowanej u osobników z sekcji *Procumbentes* (*B. procumbens*, *B. patellaris*) w korzeniach tych roślin nie zaobserwowano spor spoczynkowych (PAUL i współaut. 1992, BARR i współaut. 1995). Ponieważ jednak wykazano przyczepianie się zoospor do epidermy oraz początkowe etapy infekcji, ale nie stwierdzono obecności struktur infekcyjnych, jakimi są plazmodia, wydaje się, że opisywane mechanizmy są aktywne już w bardzo wczesnym stadium penetracji oraz że ograniczenie rozprzestrzeniania się patogena następuje wskutek reakcji nadwrażliwości (BARR i współaut. 1995). Analizy linii monosomicznych zawierających chromosomy przeniesione z *B. procumbens* wskazują, że geny odporności na *P. betae* mieszczą się na chromosomach IV i VIII (PAUL i współaut. 1992). Również inne dzikie gatunki buraków, np. z sekcji *Corollinae*, czy też pewne obiekty *B. vulgaris* ssp. *maritima* mogą posiadać tego typu mechanizmy (KINGSNORTH i współaut. 2003). Ostatnio, dzięki opracowaniu przeciwciał pozwalających na detekcję *P. betae*,

trwają intensywne prace poświęcone identyfikacji i selekcji materiałów niosących odporność na tego wektora (KINGSNORTH i współaut. 2003, ASHER i współaut. 2009). Podejście takie wydaje się uzasadnione, ponieważ, niektóre zidentyfikowane dotychczas geny *Rz* mogą być w stosunku do siebie alleliczne (GRIMMER i współaut. 2008) bądź blisko związane, co ogranicza możliwości udoskonalenia odporności na drodze rekombinacji. ASHER i współaut. (2009) wyselekcjonowali obiekty *B. vulgaris* ssp. *maritima* charakteryzujące się odpornością na *P. betae*, a następnie uzyskali odpowiednią populację segregującą. Dzięki temu zidentyfikowane zostały genetyczne determinanty współdziałające w wykształceniu cechy: QTL *Pb1* na chromosomie IV oraz QTL *Pb2* na chromosomie IX. Jednocześnie stwierdzono addytywny efekt tego źródła odporności w kombinacji z *Rz1* w odniesieniu do redukcji BNYVV po przeniesieniu jej do buraka cukrowego na drodze krzyżowania (ASHER i współaut. 2009).

W drugim przypadku, tj. odporności na wirus, wyodrębniono głównie mechanizmy związane z hamowaniem jego namnażania bądź też rozprzestrzeniania się w roślinie (SCHOLTEN i współaut. 1994, TAMADA i współaut. 1999). Genom wirusa składa się z kilku (4-5) komponentów RNA, które decydują o



Ryc. 2. Występowanie wirusów BNYVV, BVQ oraz BSBV w kompleksie potwierdzone za pomocą reakcji multipleks RT-PCR z zastosowaniem specyficznych starterów (BORODYNKO i POSPIESZNY 2007).

Wielkość produktów typowych dla poszczególnych wirusów: BNYVV – 545 pz, BSBV – 399 pz, BVQ – 291 pz (fot. Natasza Borodynko, Natalia Rymelska).

różnych aspektach infekcji, takich jak przenoszenie wirusa przez wektor, namnażanie i rozprzestrzenianie się w roślinie, stopień wirulencji. Przykładowo, RNA1 oraz RNA2 kodują białka istotne dla replikacji, enkapsydacji i przemieszczania się wirusa między komórkami, natomiast RNA3, RNA4 oraz RNA5 są związane z infekcją i rozwinięciem się choroby w korzeniach buraka. Te ostatnie elementy kodują bowiem białka zaangażowane w procesie patogenezy, przemieszczania się wektora oraz hamowania wyciszenia genów przez systemy obronne gospodarza (TAMADA i współaut. 1999, RAHIM i współaut. 2007, TAMADA 2007). Najprawdopodobniej zatem różne mechanizmy odporności są związane z odpowiedzią gospodarza na poszczególne komponenty genomu patogena.

GEYL i współaut. (1995) zidentyfikowali ekotyp S023 *B. vulgaris* ssp. *maritima*, który był podatny na *P. betae*, ale odporny na BNYVV już w początkowych stadiach infekcji. Jednocześnie w komórkach i tkankach roślin odpornych, jak i podatnych odnotowano podobne rozmieszczenie cystosorusów i plazmodiów *P. beate* oraz występowanie antygeny wirusowego w części korytkalnej aż do granicy endodermy, jak również potwierdzono zdolność wirusa do krótkodystansowej migracji oraz do namnażania w izolowanych protoplastach. Brak wirusa w korzeniach poddanych mechanicznej inokulacji może

wskazywać z kolei na tkankowo-specyficzne zahamowanie replikacji bądź przemieszczania wirusa (GEYL i współaut. 1995).

Podobnie odporność na rizomanię w odmianach Alba i Rizor, jak również w materiałach typu 'Holly' zdefiniowano jako związaną z oddziaływaniem roślina-wirus, a nie roślina-wektor (PAUL i współaut. 1993). Ogólny schemat interakcji w przypadku odmiany podatnej zakłada przemieszczanie się wirusa od zainfekowanej komórki epidermy poprzez parenchymatyczne komórki korowe, endodermę aż do parenchymatycznych komórek ksylemu, skąd dalej wirus mógłby migrować do korzenia głównego poprzez indukcję śmierci kolejnych komórek (ACOSTA-LEAL i współaut. 2008). Wykazano jednak różnice w lokalizacji i rozprzestrzenianiu się wirusa w roślinie w materiałach częściowo odpornych w zależności od źródła odporności – obserwowano odmienny przebieg wymienionych procesów dla obiektów Holly, WB42, jak również Rizor (SCHOLTEN i współaut. 1994, CHIBA i współaut. 2008), co sugeruje funkcjonowanie niezależnych mechanizmów. W przypadku WB42 wirus występował w niewielkich skupiskach ograniczonych zasięgiem do epidermy oraz niektórych korowych komórek parenchymatycznych, podczas gdy rozmieszczenie wirusa w obiekcie Holly oraz częściowo odpornej odmianie Rima sięgało poza endodermę aż do śródmiąższowej parenchymy, jednak rzadko identyfikowano wirus w wiązkach przewodzących, co przedstawiało się podobnie w przypadku odmiany podatnej (SCHOLTEN i współaut. 1994). Może to być odzwierciedleniem załamywania odporności w warunkach silnej infekcji w materiałach o niższym stopniu tolerancji. Z kolei na histologicznych przekrojach genotypów Alba obserwowano wyraźną reakcję na BNYVV rozproszony w wiązkach ksylemu. Analogicznie w odmianie Rizor stwierdzono zahamowanie transmisji BNYVV poprzez wiązki przewodzące, co utrudnia dalsze rozprzestrzenianie się wirusa w roślinie. Wydaje się, że w materiale tym może jednocześnie dochodzić do zakłóceń w przebiegu cyklu rozwojowego *P. betae*, na co wskazuje niewielka liczba obserwowanych zoosporangiów (BIANCARDI i współaut. 2002). TAMADA i współaut. (1999) zasugerowali natomiast, iż odporność w odmianie Rizor może być związana z zahamowaniem replikacji RNA3, ponieważ w głównym korzeniu nie wykryli obecności tego komponentu, pomimo występowania tam wirusa. Najprawdopodobniej

zaangażowany jest w tym przypadku mechanizm wyciszenia RNA bazujący na selektywnym niszczeniu docelowego RNA wirusowego z udziałem specyficznych elementów aparatu genetycznego, tzw. siRNA (ang. small interfering RNA), które decydują o destrukcji odpowiednich komplementarnych sekwencji poprzez oddziaływanie w zawierającym nukleazę kompleksie wyciszającym indukowanym RNA (ang. RNA-induced silencing complex, RISC) (HAMMOND 2005). Jakkolwiek mechanizmy tego typu mogą funkcjonować bardziej efektywnie w liściach niż w korzeniach (ANDIKA i współaut. 2005), hipoteza powyższa wydaje się jednak uzasadniona, zważywszy że w początkowym etapie wirus namnaża się w tkance korzenia, ale jego przemieszczanie się do korzenia głównego oraz dalsze powielanie pozostają ograniczone wraz z postępującym rozwojem systemu korzeniowego (TAMADA i współaut. 1999). Analogiczne zjawisko obserwowane jest w transgenicznym buraku, w którym początkowo dochodzi do infekcji, jednak stopniowo pojawia się odporność - nowo rozwinięte liście są już pozbawione wirusa, a niski poziom mRNA transgenu przy niezmiennym tempie transkrypcji wskazuje na wykształcenie specyficznego mechanizmu dezaktywacji tej sekwencji (LINDBO i współaut. 1993, ANDIKA i współaut. 2005). Jednocześnie istnieją sugestie, że mechanizmy wyciszenia RNA funkcjonują efektywnie również w tkance korzenia transgenicznych buraków odpornych na BNYVV i że wcześniejsze doniesienia wskazujące na ich ograniczony zakres w korzeniu mogą wynikać z innego rodzaju zastosowanych form transgenu - ssRNA vs. dsRNA (LENNEFORS 2006). Analizy zmian proteomu w odpowiedzi na infekcję BNYVV sugerują natomiast udział reakcji systemicznej w przypadku odporności bazującej na *Rz1* oraz wskazują na znaczenie fitohormonów w rozwoju symptomów choroby (LARSON i współaut. 2008). W badaniach tych, z zastosowaniem blisko izogenicznych linii różniących się pod względem *Rz1/rz1*, dowiedziono, że pewne białka podlegały odmiennej indukcji głównie w formie odpornej. Do tej grupy należały w szczególności białka związane z odpowiedzią obronną jak chitynaza, glukonaza czy defensyna oraz białka związane z odpowiedzią oksydacyjną, np. transferaza glutationu-S, oksydaza szczawianowa oraz oksydaza polifenolowa. Bez względu na odpowiadający mechanizm, w odmianach/materiałach posiadających częściową odporność odnotowuje

się wyraźnie niższe stężenia wirusa w korzeniach w porównaniu do odmian/materiałów podatnych, co, łącznie z ograniczeniem utraty plonu oraz brakiem charakterystycznych symptomów choroby w warunkach porażenia, stanowi podstawę do ich klasyfikacji (TAMADA i współaut. 1999, WISLER i współaut. 1999, AMIRI i współaut. 2003).

Badania poświęcone podatności ekotypów *B. vulgaris* ssp. *maritima* o różnym pochodzeniu na inokulację BNYVV poprzez liście wykazały, że odpowiedź rośliny jest odzwierciedleniem patogeniczności różnych izolatów wirusa. Szczególnie istotne dla infekcji systemicznej okazały się komponenty RNA3 oraz RNA5 (TAMADA 2007). Wyjątkowe znaczenie specyficznych komponentów RNA3 i RNA5 uwydatnia także fakt, iż zmienność w strukturze kodowanych przez nie białek p25 i p26 wpływa na regulację transkrypcji, a w konsekwencji na współdziałanie wymienionych komponentów w indukcji symptomów, patogeniczności i zdolności szczepów wirusa do przełamania odporności (LINK i współaut. 2005, ACOSTA-LEAL i RUSH 2007, KLEIN i współaut. 2007, CHIBA i współaut. 2008). Przykładowo, zidentyfikowano reszty aminokwasowe obecne w białku p25 zakodowanym komponentem RNA3, istotne w specyficznej dla gospodarza odpowiedzi na porażenie danym typem wirusa, decydujące o jego wirulencji/awirulencji, wpływające na oligomeryzację białka oraz rodzaj występujących objawów (KLEIN i współaut. 2007, CHIBA i współaut. 2008). Analogicznie wydaje się, że kluczową rolę dla reakcji odporności mogą również pełnić obecne w genomie buraka sekwencje RGA związane z *Rz1*, a przede wszystkim plastyczność tych sekwencji w toku oddziaływań z wirusem (LEIN i współaut. 2006).

Stwierdzono ponadto znaczące zróżnicowanie odpowiedzi i objawów pomiędzy odrębnymi obiektami, liniami, a nawet genotypami *B. maritima*, co wskazuje, iż w poszczególnych roślinach mogą wykształcać się nieco odmienne mechanizmy odporności, która powinna zatem być postrzegana jako specyficzna interakcja pomiędzy podlegającymi ekspresji genami gospodarza i patogena w danych warunkach (TAMADA 2007, CHIBA i współaut. 2008). Wyniki badań poświęconych ekspresji genów wskazują również na występowanie pewnych różnic w odpowiedzi na porażenie BNYVV w zależności od gatunku rośliny (SCHMIDLIN i współaut. 2008).

PODSUMOWANIE

Ze względu na pojawianie się izolatów BNYVV przełamujących odporność roślin, poszerzenie bazy materiałów wyjściowych do hodowli oraz wzbogacenie ich o nowe źródła odporności wydaje się niezbędne dla zapewnienia ciągłej produkcji konkurencyjnych odmian, umożliwiających plonowanie w warunkach występowania wirusa oraz dla zapobiegania rozprzestrzenianiu się patogena. Dlatego też wciąż uzasadniona jest charakterystyka genetyczna, jak również fizjopatologiczna niezidentyfikowanych dotychczas materiałów, w tym również form dzikich niosących odporność oraz łączenie różnych

jej źródeł w jednej odmianie. Podstawę do tego stanowi identyfikacja markerowych sekwencji funkcjonalnych, które znajdują zastosowanie w selekcji wspomaganą markerami molekularnymi, co pozwala na szybkie i jednoznaczne stwierdzenie obecności danego genu bez konieczności prowadzenia kosztownych i długotrwałych testów związanych z porażeniem materiału roślinnego. Analiza występowania tych sekwencji może jednocześnie przyczynić się do wyjaśnienia wykształcenia się oraz mechanizmów odporności na rizomanię.

ŹRÓDŁA I MECHANIZMY ODPORNOŚCI BURAKA CUKROWEGO ORAZ DZIKICH FORM Z RODZAJU BETA NA BNYVV

Streszczenie

Rizomania jest chorobą buraka cukrowego wywoływaną przez wirus nekrotycznego żółknięcia nerwów buraka BNYVV, który powoduje znaczące jakościowe i ilościowe straty plonu tej ekonomicznie istotnej rośliny w skali światowej. Za najbardziej skuteczną metodę walki z rozprzestrzenianiem choroby, umożliwiającą uprawę w warunkach porażenia uznaje się stosowanie odmian wyprowadzonych w toku hodowli odpornościowej. Jednakże żaden z dotychczas opisanych genów nie warunkuje całkowitej

odporności, a jedynie tolerancję na wirus. Jednocześnie z powodu pojawiania się szczepów zdolnych do przełamania odporności, przeszukiwanie zasobów dzikich form z rodzaju *Beta* jest kluczowe dla dalszej identyfikacji nowych źródeł odporności, a w konsekwencji dla utrzymania ciągłej produkcji konkurencyjnych odmian buraka cukrowego. W niniejszej pracy dokonano przeglądu znanych obecnie źródeł odporności, jak również przedstawiono podstawowe mechanizmy istotne dla jej wykształcenia.

THE RESISTANCE OF SUGAR BEET AND ITS WILD RELATIVES FROM THE GENUS BETA TO BNYVV – SOURCES AND MECHANISMS

Summary

Rhizomania is a disease of sugar beet induced by *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) that has been responsible for both quantitative and qualitative significant yield losses of this economically important crop worldwide. The most effective method of protection that enables production under infestation conditions is believed to be resistance breeding. However, none of the genes identified thus far seems to be able to condition a fully resistant geno-

type. Additionally, due to the appearance of resistance-breaking strains of the virus, screening of wild relatives is crucial for further identification of new resistance sources and, consequently, for continuous production of competitive sugar beet cultivars. This review presents an overview of currently known resistance sources as well as highlights some basic mechanisms involved in resistance expression.

LITERATURA

- ABE H., TAMADA T., 1986. Association of beet necrotic yellow vein virus with isolates of *Polymyxa betae* Keskin. Ann. Phytopath. Soc. Japan 52, 235-247.
- ACOSTA-LEAL R., RUSH C. M., 2007. Mutations associated with resistance-breaking isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* and their allelic discrimination using TaqMan technology. Phytopathology 97, 325-330.
- ACOSTA-LEAL R., FAWLEY M. W., RUSH C. M., 2008. Changes in the intrasolate genetic structure of *Beet necrotic yellow vein virus* populations associated with plant resistance breakdown. Virology 376, 60-68.
- AMIRI R., MOGHADDAM M., MESBAH M., SADEGHIAN S. Y., GHANNADHA M. R., IZADPANAH K., 2003. The inheritance of resistance to beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *B. vulgaris* subsp. *maritima*.

- tima*, accession WB42: Statistical comparisons with Holly-1-4. *Euphytica* 132, 363-373.
- AMIRI R., MESBAH M., MOGHADDAM M., BIHAMTA M. R., MOHAMMADI S. A., NOROUZI P., 2009. A new RAPD marker for beet necrotic yellow vein virus resistance gene in *Beta vulgaris*. *Biol. Plant.* 53, 112-119.
- ANDIKA I. B., KONDO H., TAMADA T., 2005. Evidence that RNA silencing-mediated resistance to Beet necrotic yellow vein virus is less effective in roots than in leaves. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 194-204.
- ASHER M. J. C., GRIMMER M. K., MUTASA-GOETTGENS E. S., 2009. Selection and characterization of resistance to *Polymyxa betae*, vector of Beet necrotic yellow vein virus, derived from wild sea beet. *Plant Pathol.* 58, 250-260.
- BARR K. J., ASHER M. J. C., LEWIS B. G., 1995. Resistance to *Polymyxa betae* in wild *Beta* species. *Plant Pathol.* 44, 301-307.
- BARZEN E., STAHL R., FUCHS E., BORCHARDT D. C., SALAMINI F., 1997. Development of coupling-repulsion-phase SCAR markers diagnostic for the sugar beet *Rr1* allele conferring resistance to *rhizomania*. *Mol. Breed.* 3, 231-238.
- BIANCARDI E., LEWELLEN R. T., DE BIAGGI M., ERICHSEN A. W., STEVANATO P., 2002. The origin of *rhizomania* resistance in sugar beet. *Euphytica* 127, 383-397.
- BORODYNKO N., POSPIESZNY H., 2007. Identyfikacja i występowanie odległowych wirusów buraka cukrowego w Polsce. *Progress Plant Protect.* 47, 55-61.
- BORODYNKO N., RYMELSKA N., HASIÓW-JAROSZEWSKA B., POSPIESZNY H., 2009. Wpływ odległowego wirusa buraka cukrowego (*Beet soil-borne virus*, *BSBV*) na plon i zawartość cukru różnych odmian buraka cukrowego w warunkach polowych. *Progress Plant Protect.* 49, 1249-1254.
- CHIBA S., MIYANISHI M., ANDIKA I. B., KONDO H., TAMADA T., 2008. Identification of amino acids of the beet necrotic yellow vein virus p25 protein required for induction of the resistance response in leaves of *Beta vulgaris* plants. *J Gen Vir* 89, 1314-1323.
- DE BIAGGI M., STEVANATO P., TREBBI D., SACCOMANI M., BIANCARDI E., 2010. Sugar beet resistance to *rhizomania*: State of the art and perspectives. *Sugar Tech.* 12, 238-242.
- DE TEMMERMAN N., ANFINRUD M., MEULEMANS M., RICK K., BURKHOLZ A., DE BRUYNE E., WEYENS G., BARNES S., HOREMANS S., LEFEBVRE M., BOLTON M. D., 2009. *Rhizomania* resistance in the Tandem® sugar beet variety. *Int. Sugar J.* 111, 313-317.
- EHLERS U., COMMANDEUR U., FRANK R., LANDSMANN J., KOENIG R., BURGERMEISTER W., 1991. Cloning of the coat protein gene from beet necrotic yellow vein virus and its expression in sugar beet hairy roots. *Theor. Appl. Genet.* 81, 777-782.
- GEYL L., GARCIA HERIZ M., VALENTIN P., HEHN A., MERDINOGLU D., 1995. Identification and characterization of resistance to *rhizomania* in an ecotype of *Beta vulgaris* subsp. *maritima*. *Plant Pathol.* 44, 819-828.
- GIDNER S., LENNEFORS B.-L., NILSSON N.-O., BENSEFELT J., JOHANSSON E., GYLLENSPETZ U., KRAFT T., 2005. QTL mapping of BNYVV resistance from the WB41 source in sugar beet. *Genome* 48, 279-285.
- GIORIO G., GALLITELLI M., CARRIERO F., 1997. Molecular markers linked to *rhizomania* resistance in sugar beet, *Beta vulgaris*, from two different sources map to the same linkage group. *Plant Breed.* 116, 401-408.
- GRIMMER M. K., TRYBUSH S., HANLEY S., FRANCIS S. A., KARP A., ASHER M. J. C., 2007. An anchored linkage map for sugar beet based on AFLP, SNP and RAPD markers and QTL mapping of a new source of resistance to Beet necrotic yellow vein virus. *Theor. Appl. Genet.* 114, 1151-1160.
- GRIMMER M. K., KRAFT T., FRANCIS S. A., ASHER M. J. C., 2008. QTL mapping of BNYVV resistance from the WB258 source in sugar beet. *Plant Breed.* 127, 650-652.
- HAMMOND S. M., 2005. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett.* 579, 5822-5829.
- HUNGER S., DI GASPERO G., MÖHRING S., BELLIN D., SCHÄFER-PREGL R., BORCHARDT D. C., DUREL C.-E., WERBER M., WEISSHAAR B., SALAMINI F., SCHNEIDER K., 2003. Isolation and linkage analysis of expressed disease-resistance gene analogues of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Genome* 46, 70-82.
- KESKIN B., 1964. *Polymyxa betae* n. sp., ein Parasit in den Wurzeln von *Beta vulgaris* Tournefort, besonders während der Jugendentwicklung der Zuckerrübe. *Arch. Mikrobiol.* 49, 348-374.
- KINGSNORTH C. S., ASHER M. J. C., KEANE G. J. P., CHWARSZCZYNSKA D. M., LUTERBACHER M. C., MUTASA-GÖTTGENS E. S., 2003. Development of a recombinant antibody ELISA test for the detection of *Polymyxa betae* and its use in resistance screening. *Plant Pathol.* 52, 673-680.
- KLEIN E., LINK D., SCHIRMER A., ERHARDT M., GILMER D., 2007. Sequence variation within Beet necrotic yellow vein virus p25 protein influences its oligomerization and isolate pathogenicity on *Tetragonia expansa*. *Virus Res.* 126, 53-61.
- KOENIG R., LÜDDECKE P., HAEBERLÉ A.-M., 1995. Detection of beet necrotic yellow vein virus strains, variants and mixed infections by examining single-strand conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *J. Gen. Virol.* 76, 2051-2055.
- KOENIG R., HAEBERLÉ A.-M., COMMANDEUR U., 1997. Detection and characterization of a distinct type of beet necrotic yellow vein virus RNA5 in a sugarbeet growing area in Europe. *Arch. Virol.* 142, 1499-1504.
- KRUSE M., KOENIG R., HOFFMANN A., KAUFMANN A., COMMANDEUR U., SOLOVYEV A. G., SAVENKOV I., BURGERMEISTER W., 1994. Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of beet necrotic yellow vein virus. *J. Gen. Virol.* 75, 1835-1842.
- LARSON R. L., WINTERMANTEL W. M., HILL A., FORTIS L., NUNEZ A., 2008. Proteome changes in sugar beet in response to Beet necrotic yellow vein virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 72, 62-72.
- LEIN J. C., ASBACH K., TIAN Y., SCHULTE D., LI C., KOCH G., JUNG C., CAI D., 2006. Resistance gene analogues are clustered on chromosome 3 of sugar beet and cosegregate with QTL for *rhizomania* resistance. *Genome* 50, 61-71.
- LENNEFORS B.-L., 2006. Molecular breeding for resistance to *rhizomania* in sugar beets. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- LENNEFORS B.-L., SAVENKOV E. I., BENSEFELT J., WREMER-WEICH E., VAN ROGGEN P., TUVESSON S., VALKONEN J. P. T., GIELEN J., 2006. dsRNA-mediated resistance to Beet Necrotic Yellow Vein Virus infections in sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*). *Mol. Breed.* 18, 313-325.
- LEWELLEN R. T., WHITNEY E. D., 1993. Registration of germplasm lines developed from composite crosses of sugar beet x *Beta maritima*. *Crop Sci.* 33, 882-883.
- LEWELLEN R. T., SKOYEN I. O., ERICHSEN A. W., 1987. Breeding sugar beet for resistance to *rhizomania*: evaluation of host-plant reactions and se-

- lection for and inheritance of resistance. Proceedings of the 50th Winter Congress of the International Institute for Sugar Beet Research II, 139–156.
- LINDBO J. A., SILVA-ROSALES L., PROEBSTING W. M., DOUGHERTY W. G., 1993. *Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance*. Plant Cell 5, 1749–1759.
- LINK D., SCHMIDLIN L., SCHIRMER A., KLEIN E., ERHARDT M., GELDREICH A., LEMAIRE O., GILMER D., 2005. *Functional characterization of the Beet necrotic yellow vein virus RNA-5-encoded p26 protein: evidence for structural pathogenicity determinants*. J. Gen. Virol. 86, 2115–2125.
- LIU H.-Y., LEWELLEN R. T., 2007. *Distribution and molecular characterization of resistance-breaking isolates of Beet necrotic yellow vein virus in the United States*. Plant Dis. 91, 847–851.
- LIU H.-Y., SEARS J. L., LEWELLEN R. T., 2005. *Occurrence of resistance-breaking Beet necrotic yellow vein virus of sugar beet*. Plant Dis. 89, 464–468.
- LUTERBACHER M. C., ASHER M. J. C., BEYER W., MANDOLINO G., SCHOLTEN O. E., FRESE L., BIANCARDI E., STEVANATO P., MECHELKE W., SLYVCHENKO O., 2005. *Sources of resistance to diseases of sugar beet in related Beta germplasm: II Soil-borne diseases*. Euphytica 141, 49–63.
- MAHMOOD T., RUSH C. M., 1999. *Evidence of cross-protection between beet soilborne mosaic virus and beet necrotic yellow vein virus in sugar beet*. Plant Dis. 83, 521–526.
- MANNERLÖF M., LENNEFORS B.-L., TENNING P., 1996. *Reduced titer of BNYVV in transgenic sugar beets expressing the BNYVV coat protein*. Euphytica 90, 293–299.
- MESBAH M., SCHOLTEN O. E., DE BOCK T. S. M., LANGE W., 1997. *Chromosome localisation of genes for resistance to Heterodera schachtii, Cercospora beticola and Polymyxa betae using sets of Beta procumbens and B. patellaris derived monosomic additions in B. vulgaris*. Euphytica 97, 117–127.
- MEULEMANS M. J., HOREMANS L., STEFAAN H., 2003. *Interactions between different major genes and influence of the genetic background in the expression of rhizomania resistance*. 1st joint IIRB-ASSBT Congress, San Antonio-Texas (USA), 161–174.
- MEUNIER A., SCHMIT J. F., STAS A., KUTLUK N., BRAGARD C., 2003. *Multiplex reverse transcription-PCR for simultaneous detection of Beet necrotic yellow vein virus, Beet soilborne virus and Beet virus Q and their vector Polymyxa betae KESKIN on sugar beet*. Appl. Environ. Microbiol. 69, 2356–2360.
- MICHELMORE R. W., MEYERS B. C., 1998. *Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process*. Genome Res. 8, 1113–1130.
- NOUHI A., AMIRI R., HAGHNAZARI A., SABA J., MESBAH M., 2008. *Tagging of resistance gene(s) to rhizomania disease in sugar beet (Beta vulgaris L.)*. Afr. J. Biotechnol. 7, 430–433.
- NOUHI A. A., AMIRI R., HAGH N. A., SABA J., MESBAH M., 2009. *Use of molecular marker for assay gene dosage resistant gene to rhizomania disease (Rz₁) in sugar beet (Beta vulgaris L.)*. Asian J. Biotechnol. 1, 37–41.
- PANELLA L., LEWELLEN R. T., 2007. *Broadening the genetic base of sugar beet: introgression from wild relatives*. Euphytica 154, 383–400.
- PAUL H., HENKEN B., DE BOCK T. S. M., LANGE W., 1992. *Resistance to Polymyxa betae in Beta species of the section Procumbentes, in hybrids with B. vulgaris and in monosomic chromo-*
- some additions of B. procumbens in B. vulgaris*. Plant Breed. 109, 265–273.
- PAUL H., HENKEN B., SCHOLTEN O. E., LANGE W., 1993. *Use of zoospores of Polymyxa betae in screening beet seedlings for resistance to beet necrotic yellow vein virus*. Neth. J. Plant Pathol. 99, 151–160.
- PELSY F., MERDINOGLU D., 1996. *Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA markers linked to a rhizomania resistance gene in sugar beet (Beta vulgaris L.) by bulked segregant analysis*. Plant Breed. 115, 371–377.
- PFERDMENGES F., KÖRF H., VARRELMANN M., 2009. *Identification of rhizomania-infected soil in Europe able to overcome Rz1 resistance in sugar beet and comparison with other resistance-breaking soils from different geographic origins*. Eur. J. Plant Pathol. 124, 31–43.
- RAHIM M. D., ANDIKA I. B., HAN C., KONDO H., TAMADA T., 2007. *RNA4-encoded p31 of beet necrotic yellow vein virus is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots*. J. Gen. Virol. 88: 1611–1619.
- RUSH C. M., LIU H.-Y., LEWELLEN R. T., ACOSTA-LEAL R., 2006. *The continuing saga of rhizomania of sugar beets in the United States*. Plant Dis. 90, 4–15.
- RYSANEK P., STOCKY G., HAEBERLÉ A. M., PUTZ C., 1992. *Immunogold labelling of beet necrotic yellow vein virus particles inside its fungal vector, Polymyxa betae K*. Agronomie 12, 651–659.
- SANFORD J. C., JOHNSTON S. A., 1985. *The concept of parasite-derived resistance – Deriving resistance genes from parasite's own genome*. J. Theor. Biol. 113, 395–405.
- SCHIRMER A., LINK D., COGNAT V., MOURY B., BEUVE M., MEUNIER A., BRAGARD C., GILMER D., LEMAIRE O., 2005. *Phylogenetic analysis of isolates of Beet necrotic yellow vein virus collected worldwide*. J. Gen. Virol. 86, 2897–2911.
- SCHMIDLIN L., DE BRUYNE E., WEYENS G., LEFEBVRE M., GILMER D., 2008. *Identification of differentially expressed root genes upon rhizomania disease*. Mol. Plant Pathol. 9, 741–751.
- SCHOLTEN O. E., LANGE W., 2000. *Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: A review*. Euphytica 112, 219–231.
- SCHOLTEN O. E., PAUL H., PETERS D., VAN LENT J. W. M., GOLDBACH R. W., 1994. *In situ localization of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in rootlets of susceptible and resistant beet plants*. Arch. Virol. 136, 349–361.
- SCHOLTEN O. E., JANSEN R. C., KEIZER L. C. P., DE BOCK T. S. M., LANGE W., 1996. *Major genes for resistance to beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in Beta vulgaris*. Euphytica 91, 331–339.
- SCHOLTEN O. E., KLEIN-LANKHORST R. M., ESSELINK D. G., DE BOCK T. S. M., LANGE W., 1997. *Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers linked to resistance against beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in Beta accessions*. Theor. Appl. Genet. 94, 123–130.
- SCHOLTEN O. E., DE BOCK T. S. M., KLEIN-LANKHORST R. M., LANGE W., 1999. *Inheritance of resistance to beet necrotic yellow vein virus in Beta vulgaris conferred by a second gene for resistance*. Theor. Appl. Genet. 99, 740–746.
- SZOTA M., 1997. *Nowe techniki uzyskiwania mieszańców oddalonych w rodzaju Beta L*. Biuletyn IHAR 202, 21–26.
- TAMADA T., 2007. *Susceptibility and resistance of Beta vulgaris subsp. maritima to foliar rub-in-*

- oculation with Beet necrotic yellow vein virus.* J. Gen. Plant Pathol. 73, 76–80.
- TAMADA T., UCHINO H., KUSUME T., SAITO M., 1999. *RNA 3 deletion mutants of beet necrotic yellow vein virus do not cause rhizomania disease in sugar beets.* Phytopathology 89, 1000–1006.
- WEILAND J. J., LARSON R. L., FREEMAN T. P., EDWARDS M. C., 2006. *First report of Beet black scorch virus in the United States.* Plant Dis. 90, 828.
- WISLER G. C., LEWELLEN R. T., SEARS J. L., LIU H. Y., DUFFUS J. E., 1999. *Specificity of TAS-ELISA for beet necrotic yellow vein virus and its application for determining rhizomania resistance in field-grown sugar beet.* Plant Dis. 83, 864–870.
- WISLER G. C., LEWELLEN R. T., SEARS J. L., WASSON J. W., LIU H.-Y., WINTERMANTEL W. M., 2003. *Interactions between Beet necrotic yellow vein virus and Beet soilborne mosaic virus in sugar beet.* Plant Dis. 87, 1170–1175.