

ANNA GRUPA, JERZY SYLLER

*Pracownia Fitopatologii  
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut Badawczy  
Oddział w Młochowie  
Platanowa 19, 05-831 Młochów  
E-mail: a.grupa@ihar.edu.pl*

## MIESZANE INFEKcje WIRUSOWE ROŚLIN: WSPÓŁDZIAŁANIE CZY RYWALIZACJA TERYTORIALNA MIĘDZY WIRUSAMI?\*

### WPROWADZENIE

Niemal wszystkie organizmy żywe podlegają infekcjom wywołanym przez rozmaite patogeny, w tym liczne gatunki wirusów. Wirusy są pasożytami obligatoryjnymi, wyróżniającymi się najszybszym tempem ewolucji. Charakteryzują się dużymi zdolnościami przystosowawczymi, które polegają między innymi na pozyskiwaniu nowych gospodarzy. Z reguły, dany gatunek bądź szczep wirusa może mieć więcej niż jednego gospodarza wśród roślin, zwierząt lub ludzi (niekiedy zarówno wśród zwierząt jak i ludzi). Z kolei, jeden osobnik (roślina, zwierzę lub człowiek) jest zazwyczaj potencjalnym gospodarzem więcej niż jednego wirusa lub szczepu wirusowego. W efekcie, organizm gospodarza może być zarażony jednocześnie dwoma lub więcej wirusami.

Mieszane infekcje wirusowe powstają w wyniku równoczesnego (koinfekcja) bądź zróznicowanego w czasie (nadkażenie, superinfekcja) wnikięcia do komórek gospodarza cząstek różnych wirusów lub różnych szczepów lub izolatów tego samego wirusa (HUGHES i współaut. 2012, SYLLER 2012). Wraz z rozwojem nauk medycznych, weterynaryjnych i fitopatologii przybywa dowodów, że mieszane infekcje wirusowe są zjawiskiem częstym i mogą stanowić poważne zagrożenie dla ludzi (np. GHEDIN i współaut. 2009,

GRIFFITHS i współaut. 2011, KUMAR i współaut. 2013), zwierząt (np. CHEN i współaut. 2004, MOSCHIDOU i współaut. 2011, LARSKA i współaut. 2012) i roślin (np. GONZÁLEZ-JARA i współaut. 2009, GIL-SALAS i współaut. 2012, SYLLER 2012). Z oczywistych względów dużo uwagi poświęca się charakteryzowaniu przebiegu i skutków mieszanych infekcji u ludzi, wiadomo bowiem, że mogą one prowadzić do całkowitego załamania systemu odpornościowego chorego organizmu (CALENDAR 1986, GHEDIN i współaut. 2009). Również wirusologia weterynaryjna ma znaczący dorobek w zakresie badań nad patogenizacją i skutkami chorób powodowanych przez jednoczesną infekcję dwoma wirusami. Najślabiej poznane są mieszane infekcje wirusowe roślin, pomimo że występują one zdecydowanie częściej niż infekcje tego typu u ludzi lub zwierząt (PRUSS i współaut. 1997). Podejmowane są wszakże próby wyjaśnienia, czy w roślinie zakażonej dwoma różnymi wirusami lub dwoma izolatami tego samego wirusa patogeny te ułatwiają sobie wzajemnie dostęp do zasobów komórek gospodarza, niezbędnych do realizacji ich cyklów życiowych, czy może ostro rywalizują ze sobą. Mówiąc w uproszczeniu, czy są one w roślinie sprzymierzeńcami czy wrogami?

\*Praca w ramach projektu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2013/09/B/NZ9/02421.

Celem artykułu jest ukazanie najważniejszych i najciekawszych aspektów wzajemnych oddziaływań wirusów roślinnych w infekcjach mieszanych. Większość interakcji między wirusami ma charakter synergistyczny lub antagonistyczny, określane również jako konkurencyjne. Od charakteru interakcji zależy funkcjonowanie zarówno każdego z wirusów w infekcji mieszanej, jak i ich gospodarza. Co więcej, przebieg interakcji

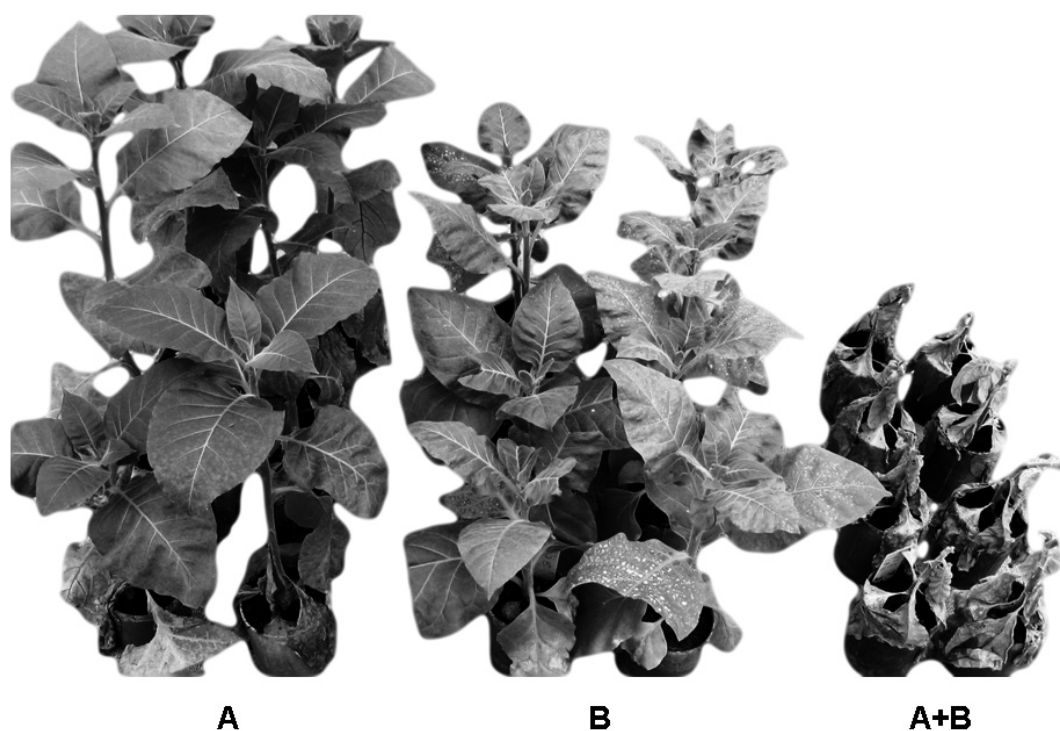
może mieć dalsze, poważniejsze konsekwencje dla całej populacji lub podpopulacji tych wirusów, zwiększając bądź redukując ich szanse na przetrwanie w naturze. Tak poważnych konsekwencji nie powodują natomiast mieszane infekcje, w których interakcje między wirusami cechuje neutralizm. Ten typ koegzystencji wirusów nie jest w artykule omawiany.

#### SYNERGIZM WE WZAJEMNYM ODDZIAŁYWANIU WIRUSÓW

Zjawisko synergizmu występuje wówczas, gdy w infekcji mieszanej jeden wirus umożliwia drugiemu osiągnięcie wysokiego poziomu akumulacji cząstek, najczęściej poprzez pozytywne oddziaływanie na jego replikację (UNTIVEROS i współaut. 2007). Wzrostowi akumulacji wirusa zwykle towarzyszy zaostrenie objawów chorobowych, w porównaniu z objawami widocznymi na roślinach porażonych tymi wirusami oddzielnie. Znaczne zaostrenie takich objawów może doprowadzić do przedwczesnej śmierci rośliny (Ryc. 1).

Synergistyczne interakcje występują zazwyczaj w mieszanych infekcjach wirusów

znacznie różniących się od siebie (LATHAM i WILSON 2008). Najczęściej przytaczanym przykładem jest zaobserwowana niemal 60 lat temu interakcja między wirusem Y ziemniaka (*Potato virus Y*, PVY), typowym przedstawicielem rodzaju *Potyvirus*, rodzina Potyviridae, i wirusem X ziemniaka (*Potato virus X*, PVX) z rodzaju *Potexvirus*, rodzina Flexiviridae, w roślinach tytoniu (*Nicotiana tabacum*) (ROCHOW i ROSS 1955). Zaobserwowano wówczas korzystne oddziaływanie koinfekcji PVY na replikację PVX, którego koncentracja wzrastała nawet 10-krotnie, w porównaniu z koncentracją w roślinach po-



Ryc. 1. Reakcja roślin tytoniu na zakażenie wirusami A i B pojedynczo i razem. Interakcja synergistyczna między wirusami spowodowała znaczne zaostrenie objawów chorobowych, prowadzące do śmierci roślin (fot. J. Syller).

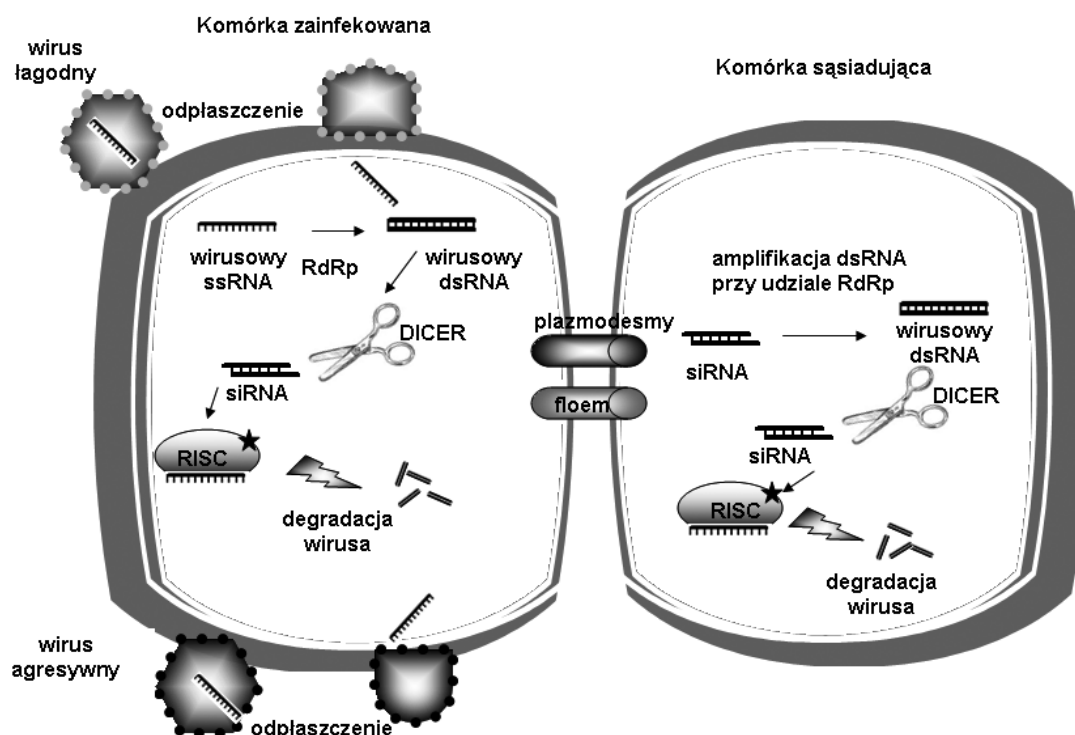
rażonych samym PVX. Dalsze, bardziej szczegółowe badania wykazały, że w roślinach tytoniu zakażonych obydwoma wirusami akumulacja zarówno genomowego RNA, jak i białka płaszczka PVX wzrastała w niemal takim samym zakresie, jak akumulacja infekcyjnych cząstek PVX (VANCE 1991). Pewnym zaskoczeniem może być fakt, że w roślinach innego gatunku tytoniu, *N. benthamiana*, obecność PVY, a także wirusa wżerkowej plamistości tytoniu (*Tobacco etch virus*, TEV) i wirusa ospowatości śliwy (*Plum pox virus*, PPV) (obydwa wirusy z rodzaju *Potyvirus*), pozostawała bez wpływu na koncentrację PVX, pomimo stwierdzonej silnej reakcji nekrotycznej roślin (patrz SYLLER 2012). Nasuwa się wniosek, że nasilenie reakcji synergistycznej zależy od gatunku rośliny gospodarza i nie jest bezpośrednio skorelowane z koncentracją wirusów w roślinie. Znajduje on silne oparcie w wynikach badań wskazujących, że koncentracja wirusa zakaźnej chlorozy pomidora (*Tomato infectious chlorosis virus*, TICV) wzrastała, a koncentracja wirusa chlorozy pomidora (*Tomato chlorosis virus*, ToCV) obniżała się w porażonych obydwoma wirusami roślinach *N. benthamiana*, natomiast koncentracja obydwu wirusów spadała w roślinach *Physalis wrightii*, w porównaniu z ich zawartością w roślinach porażonych pojedynczo (WINTERMANTEL i współaut. 2008). TICV i ToCV należą do rodzaju *Crinivirus* w rodzinie *Closteroviridae*. Zróżnicowanie charakteru interakcji między wirusami w zależności od gatunku rośliny gospodarza wskazuje, że wirusy, nawet tego samego rodzaju, mogą na tyle istotnie różnić się od siebie zdolnością przystosowania do różnych gospodarzy, że ich wzajemny stosunek nabiera wyraźnych cech współzawodnictwa. Prawdopodobnie jest tak również w przypadku *Pepper huasteco virus* (PHV) i *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), wirusów papryki należących do rodzaju *Begomovirus* w rodzinie *Geminiviridae*, które w mieszanych infekcjach wykazują synergizm działania w roślinach *N. tabacum* i *N. benthamiana*, a interakcje antagonistyczne w roślinach papryki (MÉNDEZ-LOZANO i współaut. 2003).

Wystąpienie i przebieg interakcji synergistycznej między wirusami może zależeć nie tylko od gatunku, lecz także od odmiany rośliny gospodarza. Zależność tego typu, dodatkowo z silnie zaznaczonym wpływem temperatury otoczenia na reakcję roślin i poziom akumulacji wirusów, stwierdzono w badaniach nad trzema odmianami pszenicy,

których siewki zakażono jednocześnie wirusem smugowatej mozaiki pszenicy (*Wheat streak mosaic virus*, WSMV) i odkrytym kilka lat temu w USA *Triticum mosaic virus* (TriMV) (TATINENI i współaut. 2010). Obydwa wirusy należą do rodziny *Potyviridae*, w obrębie której WSMV jest typowym przedstawicielem rodzaju *Tritimovirus*, natomiast dla TriMV utworzono nowy rodzaj *Poacevirus*. Przypadek WSMV i TriMV nie jest zapewne odosobniony, można zatem wyprowadzić uogólnioną refleksję, że zróżnicowany przebieg interakcji między wirusami w infekcjach mieszanych w zależności od odmiany rośliny uprawnej może stanowić znaczne utrudnienie w opracowaniu skutecznej strategii ochrony roślin przed skutkami infekcji.

Warto podkreślić, że w dotychczas stwierdzonych interakcjach synergistycznych między wirusami roślinnymi jednym z partnerów jest często wirus z rodzaju *Potyvirus* (SYLLER 2012). W mieszanych infekcjach obecność potywirusa zwykle działa stymulująco na replikację niespokrewnionego z nim wirusa, przy czym on sam nie czerpie korzyści z takiego partnerstwa. Jednak nie zawsze potywirus przyjmuje postawę „altruistyczną”. Odnotowano znaczący wzrost koncentracji PVY w roślinach *S. brevidens* zakażonych również wirusem mozaiki tytoniu (*Tobacco mosaic virus*, TMV, rodzaj *Tobamovirus*, rodzina *Virgaviridae*), a także koncentracji *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) w koinfekcji z *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV, *Crinivirus*, *Closteroviridae*) w roślinach wilca ziemniaczanego (*Ipomoea batatas*), popularnie zwanego batatem. Dość nieoczekiwanie, zarówno wspomniany już tritimowirus WSMV, jak i *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV, *Machlomovirus*, *Tombusviridae*) odnoszą korzyści z partnerstwa w roślinach kukurydzy. Obopólna korzyść jest również efektem interakcji synergistycznej między WSMV i TriMV w roślinach pszenicy, przy czym skala korzyści warunkowana jest siłą interakcji, ta zaś zależy od odmiany pszenicy i temperatury otoczenia, o czym była już mowa wcześniej.

Przypomnijmy, że WSMV i TriMV należą do wspólnej rodziny *Potyviridae*. Nie oznacza to jednak, że są one blisko ze sobą spokrewnione. Według dotychczasowej wiedzy, bliskie pokrewieństwo uniemożliwia zaistnienie interakcji synergistycznej między wirusami. Niezbyt bliskie pokrewieństwo zdaje się jednak nie stanowić przeszkody, bowiem interakcje synergistyczne stwierdzono, na przy-



Ryc. 2. Mechanizm zjawiska ochrony krzyżowej za pośrednictwem wirusowego RNA (wg GAL-ON i SHIBOLETH 2006, zmodyfikowana).

W procesie infekcji komórki roślinnej łagodnym szczepem wirusa, z jednoniciowego wirusowego RNA (ang. *single-stranded RNA*, ssRNA) powstają za pośrednictwem polimerazy RNA zależnej od RNA (ang. *RNA-dependent RNA polymerase*, RdRp) dwuniciowe cząsteczki RNA (ang. *double-stranded RNA*, dsRNA). Następnie, w wyniku cięcia dsRNA przez RNAzę III Dicer, powstają 21–25 nukleotydowe dwuniciowe odcinki, zwane krótkimi interferencyjnymi RNA (ang. *small interfering RNA*, siRNA), które łączą się z kompleksem wyciszającym indukowanym przez RNA (ang. *RNA-induced silencing complex*, RISC). RISC zostaje zaktywowany (RISC\*). Aktywny RISC\* z jednoniciowym siRNA służy jako sonda umożliwiająca specyficzne rozpoznawanie i degradację komplementarnych cząsteczek RNA. Transport siRNA do sąsiednich komórek odbywa się poprzez plazmodesmy i floem.

kład, między kilkoma wirusami z rodzaju *Begomovirus* (rodzina Geminiviridae), a także między dwoma wirusami z rodzaju *Crinivirus* (rodzina Closteroviridae) (SYLLER 2012).

Jak widać, przebieg oraz skutki interakcji synergistycznych między wirusami roślinnymi są zróżnicowane w formie i zależą od wirusów i rośliny gospodarza, a także od warunków środowiskowych. Zróżnicowanie form jest niewątpliwie efektem batalii genów obu wirusów i ich żywiciela. W wyniku specyficznego rozpoznania wirusowych kwasów nukleinowych lub białek przez produkty genów odporności gospodarza następuje inhibicja replikacji i akumulacji cząstek wirusa (MANDADI i SCHOLTHOF 2012). Dzieje się tak dzięki wyciszaniu (degradacji) RNA wirusowego przez system obronny rośliny. Ten naturalny mechanizm obronny, znany jako potranskrypcyjne wyciszanie genów

(ang. post-transcriptional gene silencing, PTGS), wykorzystuje małe interferujące RNA (ang. small interfering RNAs, siRNA) do destrukcji kwasu nukleinowego niepożądanego „gościa”, w tym przypadku wirusa (PAPROCKA i WOŁOSZYŃSKA 2004, MLOTSHWA i współaut. 2008). Mechanizm jest schematycznie przedstawiony na Ryc. 2. W skrócie, mechanizm PTGS działa w następujący sposób. Powstałe podczas replikacji wirusa dwuniciowe cząsteczki RNA (dsRNA) są rozpoznawane, a następnie przycinane przez roślinne nukleazy Dicer do krótkich (21–25 nukleotydów) RNA, które włączone w RISC, czyli indukowany przez RNA kompleks wyciszający (ang. RNA-induced silencing complex), precyzyjnie odnajdują matrycę przeznaczoną do nukleolitycznej degradacji (VOINNET 2009). Na tym etapie materiał genetyczny wirusa jest degradowany, dzięki czemu zahamowana zo-

staje jego replikacja, a więc i rozprzestrzenianie się wirusa w tkankach rośliny. PTGS jest procesem sekwencyjnie specyficznym, precyzyjnym oraz wydajnym (GAL-ON i SHIBOLETH 2006, CSORBA i współaut. 2009). Wirusy nie są jednak bezradne wobec stosowanej przez roślinę strategii obronnej, wiele z nich wykształciło bowiem na drodze ewolucji zdolność supresji, czyli wyciszenia PTGS. Do tego celu wirusy wykorzystują indukowane przez siebie specyficzne białka. Odgrywają one zasadniczą rolę w reakcji synergistycznej. Najlepiej poznane jest indukowane przez potywirusy wielofunkcyjne białko HC-Pro, posiadające zdolność supresji reakcji obronnej rośliny, skierowanej nie tylko przeciw potywirusowi,

lecz także przeciwko heterologicznemu partnerowi w infekcji mieszanej (PRUSS i współaut. 1997, SYLLER 2006, FUKUZAWA i współaut. 2010). Podobną zdolność mają specyficzne białka indukowane przez inne wirusy, wśród których stosunkowo najlepiej poznane zostały funkcje białka 2b, kodowanego przez gen wirusa mozaiki ogórka (*Cucumber mosaic virus*, CMV, rodzaj *Cucumovirus*, rodzina Bromoviridae) (VOINNET i współaut. 1999), oraz białka P1, kodowanego przez WSMV (STENGER i współaut. 2007), *Cassava brown streak virus* (CBSV, *Ipomovirus*, Potyviridae) (MBANZIBWA i współaut. 2009) i *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV, *Ipomovirus*, Potyviridae) (GINER i współaut. 2010).

#### ANTAGONIZM WE WZAJEMNYM ODDZIAŁYWANIU WIRUSÓW

W przeciwieństwie do synergizmu, oddziaływania antagonistyczne występują wśród wirusów blisko ze sobą spokrewnionych, zwłaszcza między izolatami lub szczepami tego samego gatunku. Charakteryzują się tym, że we wspólnym gospodarzu jeden wirus hamuje czynności życiowe drugiego, bądź zachodzi zjawisko wzajemnego ograniczania. W krańcowym przypadku, wirus słabiej przystosowany do określonych warunków może zostać całkowicie wyeliminowany ze środowiska naturalnego.

Przebieg interakcji między dwoma wirusami w komórkach/tkankach rośliny gospodarza może w istotnym stopniu zależeć od tego, czy wirusy wniknęły do rośliny w krótszym bądź dłuższym odstępie czasowym, czy równocześnie. Warto przypomnieć, że w warunkach naturalnych wirusy przenoszone są z rośliny na roślinę najczęściej za pośrednictwem owadów-wektorów (SYLLER 2001). Jeśli dwa wirusy wprowadzane są do rośliny w odstępie czasowym co najmniej kilku dni, wówczas wirus zasiedlający roślinę jako pierwszy ma potencjalną przewagę nawet nad bardziej wirulentnym (agresywnym) konkurentem, ma on bowiem wystarczająco dużo czasu na zasiedlenie znacznej liczby komórek gospodarza. Natomiast wirusy wnikające do komórki roślinnej równocześnie mają, przynajmniej teoretycznie, jednakowe szanse namnażania, transportu międzykomórkowego i zasiedlania tkanki roślinnej. W praktyce, szanse te w dużej mierze zależą od potencjału replikacyjnego i zdolności przystosowawczych wirusa, które odgrywa-

ją decydującą rolę w warunkach rywalizacji z wirusem konkurencyjnym (SYLLER 2012).

#### ODPORNOŚĆ KRZYŻOWA

Znaną formą interakcji antagonistycznej między wirusami jest odporność krzyżowa, określana również, zwłaszcza w praktyce rolniczej, jako ochrona krzyżowa (ang. cross-protection) (ZIEBELL i CARR 2010), bądź, coraz częściej, terminem superinfection exclusion (GONZÁLEZ-JARA i współaut. 2009, DAPALMA i współaut. 2010, FOLIMONOVA i współaut. 2010, JULVE i współaut. 2013), którego odpowiednikiem w polskiej literaturze wirusologicznej mogłoby być określenie 'ekskluzyja nadkażenia'. Ciekawe to zjawisko opisał w 1929 r. McKinney, który odkrył, że porażenie roślin tytoniu „zielonym szczepem” TMV chroni je przed infekcją przez „żółty szczep” wirusa. Późniejsze badania dowiodły, że zjawisko odporności krzyżowej występuje u wielu gatunków roślin w efekcie infekcji wirusami reprezentującymi różne rodzaje i rodziny. Było ono, i niekiedy nadal jest, wykorzystywane w praktyce rolniczej, gdzie celowe zakażenie roślin łagodnym bądź laboratoryjnie osłabionym szczepem wirusa chroni je (z różnym zresztą skutkiem) przed infekcją szczepem o większej wirulencji, powodującym poważniejsze straty w plonach (GAL-ON i SHIBOLETH 2006, NISHIGUCHI i KOBAYASHI 2011). Możliwość praktycznego stosowania tej metody budzi jednak wątpliwości. HULL (2002) wyraził opinię, że ma ona kilka zasadniczych wad: (1) porażenie roślin nawet łagodnym szczepem wirusa często powodu-

je obniżenie plonu o 5–10%, (2) porażone rośliny stają się rezerwuarem wirusa, który może stanowić poważne zagrożenie dla gatunków lub odmian roślin uprawnych podatnych na zakażenie tym patogenem, (3) istnieje niebezpieczeństwo, że szczep łagodny może zmutować w niektórych roślinach do formy agresywnej, (4) istnieje niebezpieczeństwo, że mieszana infekcja z innym, niespokrewnionym wirusem wywoła groźną w skutkach chorobę roślin, (5) inokulowanie roślin wirusem jest zabiegiem pracochłonnym, zwłaszcza w odniesieniu do upraw jednorocznych, (6) istnieje niebezpieczeństwo, że genom szczepu łagodnego może ulec rekombinacji z genomem innego wirusa, a w efekcie tego zdarzenia powstanie wirus o odmiennych właściwościach. Obaw zawartych w tej opinii nie podzielają NISHIGUCHI i KOBAYASHI (2011). Twierdzą oni, że metoda krzyżowej ochrony roślin może być stosowana w szerokiej praktyce rolniczej, pod warunkiem, że o użyciu łagodnego szczepu wirusa będą decydowały następujące jego właściwości: (1) porażenie nie wywołuje żadnych objawów chorobowych, ewentualnie tylko słabe objawy, które nie wpływają na plon roślin, (2) szczep poraża systemicznie większość tkanek rośliny gospodarza, (3) właściwości genetyczne szczepu są stabilne i nie ma niebezpieczeństwa mutacji prowadzącej do powstania szczepu agresywnego, (4) nie ma niebezpieczeństwa przeniesienia szczepu przez wektory na inne uprawy, (5) szczep chroni rośliny przed infekcją wywołowaną przez wiele wirusów i ich szczepów, oraz (6) uzyskiwanie potrzebnej ilości inokulum o wymaganej jakości oraz procedura inokulacji roślin są łatwe i niekosztowne.

Wydaje się mało prawdopodobne, by spełnienie wszystkich, skądinąd słusznych, warunków postulowanych przez NISHIGUCHI i KOBAYASHI (2011) było wykonalne w praktyce. Zjawisko odporności krzyżowej jest jednak na tyle intrygujące, że potrzeba wyjaśnienia jego molekularnych mechanizmów nie powinna budzić wątpliwości. Dotychczas pojawiały się tylko hipotezy. Przypuszczano, między innymi, że mechanizm obronny uruchomiony w roślinie przez infekcję łagodnym szczepem wirusa blokuje uwalnianie się RNA szczepu agresywnego z płaszcza białkowego, zapobiegając w ten sposób jego replikacji. Obecnie przeważa pogląd, że istotą odporności krzyżowej jest wspomniane już zjawisko wyciszania RNA wirusowego

(NISHIGUCHI i KOBAYASHI 2011). W odpowiedzi na infekcję wirusem, w roślinie indukowany jest sygnał uruchamiający mechanizm PTGS (Ryc. 2). W sytuacji, gdy do tkanki rośliny wnika kolejny wirus, wykazujący duży stopień homologii z wirusem już obecnym w roślinie, strategia obronna gospodarza ukierunkowuje się na zdegradowanie RNA „intruza”.

Ten pozornie prosty schemat działania ochrony krzyżowej nie jest pozbawiony wielu słabych punktów i niejasności, a ponadto, nie zawsze znajdował potwierdzenie w wynikach badań z zastosowaniem typowo modelowych obiektów, na przykład rośliny *Arabidopsis thaliana* (NISHIGUCHI i KOBAYASHI 2011). Stwierdzono, między innymi, wystąpienie ochrony krzyżowej między szczepami CMV w mutantach *A. thaliana*, pomimo wcześniejszego zablokowania w nich sygnału wyciszania RNA (ZIEBELL i CARR 2009). Trzeba jednak podkreślić, że wnioskowanie w tego typu badaniach jest obciążone sporym ryzykiem popełnienia błędu, niekiedy trudno jest bowiem wykluczyć wpływ rozmaitych innych czynników, związanych z patogenem lub gospodarzem, na przebieg interakcji wirus-roślina.

W trakcie niektórych badań stwierdzono, że wirus konkurencyjny, wnika do tkanki roślinnej w drugiej kolejności, jest w stanie zasiedlać tylko te komórki gospodarza, które nie zostały jeszcze opanowane przez wirus, zazwyczaj homologiczny, który jako pierwszy pojawił się w roślinie. Występuje tu zatem, podobnie jak w przypadku koinfekcji, zjawisko oddzielenia przestrzennego między populacjami dwóch wirusów. Wirusem konkurencyjnym może być nowopowstały wariant w obrębie populacji zdominowanej przez tzw. dziki (pierwotny, oryginalny) typ wirusa. Paradoksalnie, niemożność wnikięcia przez wirus konkurencyjny do komórek zajętych już przez inny wirus (np. dziki szczep) może, z ewolucyjnego punktu widzenia, okazać się dla wirusa konkurencyjnego korzystna. Nie dzieli on bowiem komórek gospodarza z innym wirusem, może zatem swobodnie korzystać z ich zasobów, niezbędnych do utrzymania procesu replikacji. Z kolei dynamiczna replikacja, a w jej efekcie wysoka koncentracja wirusa w roślinie, sprzyja jego efektywnemu rozprzestrzenianiu, najczęściej za pośrednictwem owadów-wektorów, a w konsekwencji umacnianiu jego pozycji w danej populacji (SYLLER 2012).

## ODDZIELENIE PRZESTRZENNE

Zjawisko oddzielenia przestrzennego występuje w spektakularnej formie najczęściej wówczas, gdy dwa wirusy powodują infekcję rośliny w tym samym czasie, bądź w krótkim odstępie czasu. Tego typu podwójną infekcję określa się mianem koinfekcji. Termin 'oddzielenie przestrzenne' trafnie oddaje istotę zjawiska, jakkolwiek w anglojęzycznej literaturze wirusologicznej stosowane są również inne określenia, jak mutual exclusion (wzajemne wykluczenie), mutual suppression (wzajemne tłumienie) i mutual competitive suppression (wzajemne konkurencyjne tłumienie) (patrz SYLLER 2012). Istotą zjawiska jest to, że w roślinie gospodarzu populacje wirusów blisko ze sobą spokrewnionych lub podpopulacje tego samego gatunku wirusa nie mieszają się ze sobą, lecz przeciwnie, odseparowują się od siebie, zajmując oddzielne przestrzenie, a cząstki wirusów konkurujących populacji sąsiadują ze sobą bezpośrednio tylko w wąskiej strefie granicznej (DIETRICH i MAISS 2003, TAKESHITA i współaut. 2004, TAKAHASHI i współaut. 2007).

Badania nad tą formą interakcji między wirusami w mieszanych infekcjach roślin były podejmowane rzadko, w porównaniu z częstotliwością i zakresem badań nad koinfekcjami wirusów i innych organizmów pasożytniczych wywołujących infekcje u ludzi (PEPIN i współaut. 2008, BALMER i współaut. 2009). Zjawisko oddzielenia przestrzennego zaobserwowano już niemal 50 lat temu podczas badań nad roślinami owsa inokulowanymi we wczesnym okresie rozwoju trzema szczepami wirusa żółtej karłowatości jęczmienia (*Barley yellow dwarf virus*, BYDV, rodzina Luteoviridae) (JEDLINSKI i BROWN 1965). W ostatnich latach, zastosowanie metod immunofluorescencyjnych okazało się przełomowe w badaniu i dokumentowaniu efektów interakcji między wirusami homologicznymi w tkankach roślin gospodarzy. Występowanie omawianego zjawiska stwierdzono w przypadku dwóch podpopulacji PPV, znakowanych fluorochromami GFP (ang. green fluorescent protein) i DsRed (ang. red fluorescent protein; mutant) w tkankach *N. benthamiana* (DIETRICH i MAISS 2003). Nieco później, do analizy dystrybucji przestrzennej dwóch podpopulacji jednego z wirusów jabłoni (*Apple latent spherical virus*, ALSV, rodzaj *Cheravirus*, bez przydziału do rodziny) w tkankach roślin *Chenopodium quinoa*, oraz dwóch podpopulacji

wirusa żółtej mozaiki fasoli (*Bean yellow mosaic virus*, BMV, *Potyvirus*, Potyviridae) w tkankach *N. benthamiana*, użyto fluorochromów YFP (ang. yellow fluorescent protein) i CFP (ang. cyan fluorescent protein) (TAKAHASHI i współaut. 2007). Badania wykazały, że w tkankach roślinnych różnie wybarwione podpopulacje ALSV i BMV odseparowały się od siebie, zajmując oddzielne przestrzenie. Z kolei badania z zastosowaniem innych metod dostarczyły dowodów na występowanie zjawiska oddzielenia przestrzennego między podpopulacjami CMV-LE i CMV-m2 w tkankach *Vigna sinensis* (TAKESHITA i współaut. 2004). Metodą hybrydyzacji *in situ*, która umożliwiała analizę dokładnej lokalizacji oraz szybkości przemieszczania się wirusów z badanych podpopulacji w tkankach rośliny gospodarza, zobrazowano zjawisko przestrzennej separacji CMV-LE i CMV-m2. Co ciekawe, oba wirusy zajmowały naprzeciwległe pozycje w układzie przewodzącym liści. Bezpośredni wpływ na dynamikę przestrzennego ograniczania konkurenta miała szybkość transportu międzykomórkowego wirusów z obu podpopulacji CMV. Stwierdzono, że szybsze międzykomórkowe przemieszczanie się CMV-LE doprowadzało do powstawania specyficznej blokady układu przewodzącego zainfekowanych roślin, ograniczającej rozprzestrzenianie się CMV-m2 (TAKESHITA i współaut. 2004).

Zjawisko oddzielenia przestrzennego wirusów w mieszanych infekcjach roślin zdaje się występować w naturze częściej niż się przypuszcza i może mieć poważne implikacje dla epidemiologii chorób wywoływanych przez te wirusy (DIETRICH i MAISS 2003; TAKAHASHI i współaut. 2007). Separacja ogranicza możliwość konkurowania ze sobą różnych genetycznie wariantów tego samego wirusa, zmniejszając tym samym prawdopodobieństwo wyeliminowania wariantów gorzej przystosowanych do warunków egzystencji, a w konsekwencji przyczyniając się do wzrostu siły całej populacji wirusa (ELENA i współaut. 2011). Cytowani autorzy twierdzą również, że zasługującym na uwagę efektem separacji przestrzennej może być mniejsza ogólna częstotliwość rekombinacji w obrębie danego gatunku wirusa, a tym samym ograniczone pojawianie się nowych jego wariantów, które mogłyby stanowić zagrożenie dla wariantów już istniejących.

## ZAKOŃCZENIE

Różnorodność wzajemnych oddziaływań wirusów w mieszanych infekcjach roślin powoduje, że zarówno biologiczne, jak i epidemiologiczne skutki synergistycznych i antagonistycznych interakcji między tymi patogenami są trudne lub wręcz niemożliwe do przewidzenia. Poznawanie wzajemnego oddziaływania wirusów stwarza jednak szansę wyjaśnienia patogenezы powodowanych przez nie chorób, a w konsekwencji rozwijania efektywnych strategii ich zwalczania (READ i TAYLOR 2001, GARCIA-ARENAL i współaut. 2003). Co więcej, poznanie interakcji między wirusami może przyczynić się do lepszego zrozumienia ich ewolucji, co wydaje się być zadaniem niezwykle trudnym ze względu na duże tempo zmian tych patogenów. Istotnym utrudnieniem jest również ciągłość koewolucji wirus-roślina, w którym to procesie istotną rolę odgrywają różne czynniki związane zarówno z patogenem, jak i z jego gospodarzem.

Istotnym dla epidemiologii chorób wirusowych aspektem infekcji mieszanych jest kondycja i dynamika populacji wirusów wyselekcjonowanych w następstwie synergistycznych lub antagonistycznych interakcji między wirusami. Interakcje synergistyczne między spokrewnionymi wirusami zasiedla-

jącymi te same komórki gospodarza sprzyjają występowaniu rekombinacji lub pseudorekombinacji genetycznych, prowadzących niekiedy do powstania nowych wariantów wirusowych, wykazujących większą wirulencję lub lepsze przystosowanie do warunków środowiskowych, w porównaniu z formami rodzicielskimi (MIRALLES i współaut. 2001, GARCÍA-ARENAL i współaut. 2003, CHAKRABORTY i współaut. 2008). Nowe warianty wirusa wykorzystują swój potencjał w celu przetrwania w naturze, a następnie utrwalenia pozycji w populacji. Efektem pojawienia się nowych wariantów są zmiany w genetycznej strukturze populacji wirusa. Częstość zachodzenia rekombinacji jest zatem ważnym czynnikiem określającym poziom zróżnicowania genetycznego w obrębie danej populacji. Z kolei towarzyszące interakcjom antagonistycznym oddzielenie przestrzenne spokrewnionych wirusów w tkankach rośliny gospodarza może w istotny sposób ograniczać szansę zaistnienia rekombinacji między nimi. Może ono jednak, jak wspomniano, przyczynić się do wzrostu potencjału całej populacji wirusa poprzez zmniejszenie ryzyka wyeliminowania wariantów gorzej przystosowanych do aktualnych warunków egzystencji.

## MIESZANE INFЕКCJE WIRUSOWE ROŚLIN: WSPÓŁDZIAŁANIE CZY RYWALIZACJA TERYTORIALNA MIĘDZY WIRUSAMI?

## Streszczenie

Mieszane infekcje wirusowe powstają w wyniku zróżnicowanego w czasie (nadkażenie) bądź równoczesnego (koinfekcja) wniknięcia do komórek gospodarza cząstek różnych wirusów lub różnych szczepów tego samego wirusa. Interakcje między wirusami w roślinie gospodarza klasyfikowane są najczęściej jako synergistyczne lub antagonistyczne. Zjawisko synergizmu zachodzi wówczas, gdy obecność jednego wirusa wpływa stymulująco na dynamikę replikacji drugiego. Ma miejsce, gdy wirus obecny w roślinie tłumy, za pośrednictwem indukowanego przez siebie białka, potraskrypcyjnie wycisza genu (PTGS), czyli naturalną reakcję obronną rośliny, która może zostać skierowana przeciwko innemu wirusowi, wnikającemu do rośliny. Wzrostowi akumulacji wirusów w roślinie zwykle towarzyszy zaostrzenie objawów chorobowych, w porównaniu z objawami na roślinach porażonych tymi wirusami oddzielnie. Poważne zaostrzenie procesu chorobowego towarzyszące interakcji synergistycznej może doprowadzić do przedwczesnej śmierci rośliny. W przeciwieństwie do synergizmu, istotą oddziaływań antagonistycznych

jest hamowanie czynności życiowych jednego wirusa przez drugi wirus. Typowym przykładem interakcji antagonistycznej jest odporność (ochrona) krzyżowa, zjawisko wykorzystywane w ochronie roślin przed porażeniem przez wirulentne szczepy wirusów. Przeważa hipoteza, że ten typ odporności opiera się na zjawisku wyciszenia RNA wirusowego. W odpowiedzi na infekcję wirusem, w roślinie indukowany jest sygnał uruchamiający mechanizm PTGS. W sytuacji, gdy do tkanki rośliny wnika kolejny wirus, o dużym stopniu homologii z wirusem już w niej obecnym, strategia obronna rośliny ukierunkowuje się na zdegradowanie jego RNA. Ochrona krzyżowa może wiązać się z wystąpieniem w roślinie zjawiska tzw. oddzielenia przestrzennego. W spektakularnej formie zachodzi ono wtedy, gdy homologiczne wirusy równocześnie wnikają do rośliny. Wówczas ich podpopulacje odseparowują się od siebie, zasiedlając różne komórki w tkance gospodarza. W opinii wirusologów, poznanie interakcji między wirusami jest istotne dla zrozumienia ewolucji i patogenezы tych pasożytów.



## MIXED VIRAL INFECTIONS IN PLANTS: CO-OPERATION OR TERRITORIAL RIVALRY BETWEEN VIRUSES?

## Summary

Mixed infections occur when two or more viruses or strains of the same species invade the host at different times (super-infection) or simultaneously (co-infection). Interactions between plant viruses in mixed infections are generally categorized as synergistic or antagonistic. Synergism refers to a situation in which the presence and activity of one virus stimulates the replication dynamics of the second virus. The phenomenon occurs when the virus present in the host plant suppresses, by a specific viral protein, post-transcriptional gene silencing (PTGS), i. e. a natural plant defense response, and may target another virus entering the plant cells. The increase in virus accumulation is usually associated with an enhanced severity of disease symptoms exhibited by the plant, as compared with those shown by singly infected plants. Severe response to the multiple infection may lead to the premature death of the plant. Unlike synergism, antagonistic interactions rely on the inhibition of life functions of one virus

by a second virus. A typical example of antagonistic interaction is cross-protection, the phenomenon used to protect cultivated plants against infection by virulent strains of viruses. According to the currently prevailing hypothesis, behind this phenomenon is the mechanism of viral RNA silencing. In response to infection, a signal is induced in the plant which initiates PTGS to degrade RNA of a homologous virus. Cross-protection can be manifested in the host tissue by the occurrence of spatial separation between the viral subpopulations. In its spectacular form this phenomenon occurs when two or more homologous viruses invade the plant simultaneously. Then their subpopulations separate from each other, thus colonizing different cells in the host tissue. Virologists believe that good knowledge of within-host interactions between viruses will contribute to a better understanding of viral evolution and pathogenesis.

## LITERATURA

- BALMER O., STEARNS S. C., SCHÖTZAU A., BRUN R., 2009. *Intraspecific competition between co-infecting parasite strains enhances host survival in African trypanosomes*. *Ecology* 90, 3367–3378.
- CALENDAR R., 1986. *Viral transactivation*. *Bio/Technology* 4, 1074–1077.
- CHAKRABORTY S., VANITHARANI R., CHATTOPADHYAY B., FAUQUET C. M., 2008. *Supervirulent pseudorecombination and asymmetric synergism between genomic components of two distinct species of begomovirus associated with severe tomato leaf curl disease in India*. *J. Gen. Virol.* 89, 818–828.
- CHEN Y., ZHAO Y., HAMMOND J., HSU H., EVANS J., FELDLAUFER M., 2004. *Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses*. *J. Invert. Pathol.* 87, 84–93.
- CSORBA T., PANTALEO V., BURGYÁN J., 2009. *RNA silencing, an antiviral mechanism*. *Adv. Virus Res.* 75, 35–71.
- DAPALMA T., DOONAN B.P., TRAGER N. M., KASMAN L. M., 2010. *A systematic approach to virus-virus interactions*. *Virus Res.* 149, 1–9.
- DIETRICH C., MAISS E., 2003. *Fluorescent labelling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected Nicotiana benthamiana plants*. *J. Gen. Virol.* 84, 2871–2876.
- ELENA S. F., BEDHOMME S., CARRASCO P., CUEVAS J. M., DE LA IGLESIA F., LAFFORGUE G., LALIĆ J., PRÓSPER A., TROMAS N., ZWART M. P., 2011. *The evolutionary genetics of emerging plant RNA viruses*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24, 287–293.
- FOLIMONOVA S. Y., ROBERTSON C. J., SHILTS T., FOLIMONOV A. S., HILF M. E., GARNSEY S. M., DAWSON W. O., 2010. *Infection with strains of Citrus tristeza virus does not exclude superinfection by other strains of the virus*. *J. Virol.* 84, 1314–1325.
- FUKUZAWA N., ITCHODA N., ISHIHARA T., GOTO K., MASUTA C., MATSUMURA T., 2010. *HC-Pro, a potyvirus RNA silencing suppressor, cancels cycling of*
- Cucumber mosaic virus in Nicotiana benthamiana plants*. *Virus Genes* 40, 440–446.
- GAL-ON A., SHIBOLETH Y. M., 2006. *Cross protection*. [W:] *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses*. Loebenstein G., Carr J. P. (reds). Springer, Dordrecht, 261–288.
- GARCÍA-ARENAL F., FRAILE A., MALPICA J. M., 2003. *Variation and evolution of plant virus populations*. *Int. Microbiol.* 6, 225–232.
- GHEDEIN E., FITCH A., BOYNE A., GRIESEMER S., DEPASSE J., BERA J., ZHANG X., HALPIN R. A., SMIT M., JENNINGS L., ST. GEORGE K., HOLMES E. C., SPIRO D. J., 2009. *Mixed infection and the genesis of influenza virus diversity*. *J. Virol.* 83, 8832–8841.
- GIL-SALAS F. M., PETERS J., BOONHAM N., CUADRADO I. M., JANSSEN D., 2012. *Co-infection with Cucumber vein yellowing virus and Cucurbit yellow stunting disorder virus leading to synergism in cucumber*. *Plant Pathol.* 61, 468–478.
- GINER A., LAKATOS L., GARCÍA-CHAPA M., LÓPEZ-MOYA J. J., BURGYÁN J., 2010. *Viral protein inhibits RISC activity by Argonaute binding through conserved WG/GW motifs*. *PLoS Pathogens* 6, e1000996.
- GONZÁLEZ-JARA P., FRAILE A., CANTO T., GARCÍA-ARENAL F., 2009. *The multiplicity of infection of a plant virus varies during colonization of its eukaryotic host*. *J. Virol.* 83, 7487–7494.
- GRIFFITHS E. C., PEDERSEN A. B., FENTON A., PETCHEY O. L., 2011. *The nature and consequences of coinfection in humans*. *J. Infect.* 63, 200–206.
- HUGHES J., ALLEN R. C., BAGUELIN M., HAMPSON K., BAILLIE G. J., ELTON D., NEWTON J. R., KELLAM P., WOOD J. L. N., HOLMES E. C., MURCIA P. R., 2012. *Transmission of equine influenza virus during an outbreak is characterized by frequent mixed infections and loose transmission bottlenecks*. *PLoS Pathog.* 8: e1003081. doi: 10.1371/journal.ppat.1003081.
- HULL R., 2002. *Matthews' plant virology*. 4th edn San Diego, Academic Press.

- JEDLIŃSKI H., BROWN C. M., 1965. *Cross protection and mutual exclusion by three strains of barley yellow dwarf virus in Avena sativa L.* Virology, 26, 613–621.
- JULVE J.M., GANDÍA A., FERNÁNDEZ-DEL-CARMEN A., SARRION-PERDIGONES A., CASTELIJNS B., GRANELL A., ORZAEZ D., 2013. *A coat-independent superinfection exclusion rapidly imposed in Nicotiana benthamiana cells by tobacco mosaic virus is not prevented by depletion of the movement protein.* Plant Mol. Biol. 81, 553–564.
- KUMAR S., KHADWAL A., VERMA S., SINGHI S. C., 2013. *Immune thrombocytopenic purpura due to mixed viral infections.* Indian J. Pediatr. 80, 421–422.
- LARSKA M., POLAK M. P., RIITHO V., STRONG R., BELÁK S., ALENIUS S., UTTENTHAL Å., LIU L., 2012. *Kinetics of single and dual infection of calves with an Asian atypical bovine pestivirus and a highly virulent strain of bovine viral diarrhoea virus 1.* Comp. Immunol. Microb. 35, 381–390.
- LATHAM J. R., WILSON A. K., 2008. *Transcomplementation and synergism in plants: implications for viral transgenes?* Mol. Plant Pathol. 9, 85–103.
- MANDADI K. K., SCHOLTHOF K.-B. G., 2012. *Characterization of a viral synergism in the monocot Brachypodium distachyon reveals distinctly altered host molecular processes associated with disease.* Plant Physiol. 160, 1432–1452.
- MBANZIBWA D. R., TIAN Y., MUKASA S. B., VALKONEN J. P. T., 2009. *Cassava brown streak virus (Potyviridae) encodes a putative Maf/HAM1 pyrophosphatase implicated in reduction of mutations and a P1 proteinase that suppresses RNA silencing but contains no HC-Pro.* J. Virol. 83, 6934–6940.
- MÉNDEZ-LOZANO J., TORRES-PACHECO I., FAUQUET C. M., RIVERA-BUSTAMANTE R. F., 2003. *Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: Pepper huasteco virus and Pepper golden mosaic virus.* Phytopathology 93, 270–277.
- MIRALLES R., FERRER R., SOLÉ R. V., MOYA A., ELENA S. V., 2001. *Multiple infection dynamics has pronounced effects on the fitness of RNA viruses.* J. Evol. Biol. 14, 654–662.
- MLOTSHWA S., PRUSS G. J., VANCE V., 2008. *Small RNAs in viral infection and host defense.* Trends Plant Sci. 13, 375–382.
- MOSCHIDOU P., MARTELLA V., LORUSSO E., DESARIO C., PINTO P., LOSURDO M., CAPELLA C., PARISI A., Bányai K., BUONAVOGLIA C., 2011. *Mixed infection by Feline astrovirus and Feline panleukopenia virus in a domestic cat with gastroenteritis and panleukopenia.* J. Vet. Diagn. Invest. 23, 581–584.
- NISHIGUCHI M., KOBAYASHI K., 2011. *Attenuated plant viruses: preventing virus diseases and understanding the molecular mechanism.* J. Gen. Plant Pathol. 77, 221–229.
- PAPROCKA M., WOŁOSZYŃSKA M., 2004. *Potraskrypcyjne wyciszenie genów u roślin.* Kosmos 53, 193–200.
- PEPIN K. M., LAMBETH K., HANLEY K. A., 2008. *Asymmetric competitive suppression between strains of dengue virus.* BMC Microbiol. 8, 28. doi:10.1186/1471-2180-82-8.
- PRUSS G., GE X., SHI X. M., CARRINGTON J. C., VANCE V. B., 1997. *Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses.* Plant Cell 9, 859–868.
- READ A. F., TAYLOR L. H., 2001. *The ecology of genetically diverse infections.* Science 292, 1099–1102.
- ROCHOW W. F., ROSS A. F., 1955. *Virus multiplication in plants doubly infected by potato viruses X and Y.* Virology 1, 10–27.
- STENGER D. C., YOUNG B. A., QU F., MORRIS F. T., FRENCH R., 2007. *Wheat streak mosaic virus lacking helper component-proteinase is competent to produce disease synergism in double infections with Maize chlorotic mottle virus.* Phytopathology 97, 1213–1221.
- SYLLER J., 2001. *Mechanizmy przenoszenia wirusów roślinnych i zwierzęcych przez stawonogi.* Kosmos 50, 29–38.
- SYLLER J., 2006. *The roles and mechanisms of helper component proteins encoded by potyviruses and caulimoviruses.* Physiol. Mol. Plant Pathol. 67, 119–130.
- SYLLER J., 2012. *Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections.* Mol. Plant Pathol. 13, 204–216.
- TAKAHASHI T., SUGAWARA T., YAMATSUTA T., ISOGAI M., NATSUAKI T., YOSHIKAWA N., 2007. *Analysis of the spatial distribution of identical and two distinct virus populations differently labeled with cyan and yellow fluorescent proteins in coinfecting plants.* Phytopathology 97, 1200–1206.
- TAKESHITA M., SHIGEMUNE N., KIKUHARA K., FURUYA N., TAKANAMI Y., 2004. *Spatial analysis for exclusive interactions between subgroups I and II of Cucumber mosaic virus in cowpea.* Virology 328, 45–51.
- TATINENI S., GRAYBOSCH R. A., HEIN G. L., WEGULO S. N., FRENCH R., 2010. *Wheat cultivar-specific disease synergism and alteration of virus accumulation during co-infection with Wheat streak mosaic virus and Triticum mosaic virus.* Phytopathology 100, 230–238.
- UNTIVEROS M., FUENTES S., SALAZAR L., 2007. *Synergistic interaction of Sweet potato chlorotic stunt virus (Crinivirus) with carla, cucumo-, ipomo-, and potyviruses infecting sweet potato.* Plant Dis. 91, 669–676.
- VANCE V. B., 1991. *Replication of potato virus X RNA is altered in coinfections with potato virus Y.* Virology 182, 486–494.
- VOINNET O., 2009. *Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs.* Cell 136, 669–687.
- VOINNET O., PINTO Y. M., BAULCOMBE D. C., 1999. *Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 14147–14152.
- WINTERMANTEL W. M., CORTEZ A. A., ANCHIETA A. G., GULATI-SAKHUJA A., HLADKY L. L., 2008. *Co-infection by two criniviruses alters accumulation of each virus in a host-specific manner and influences efficiency of virus transmission.* Phytopathology 98, 1340–1345.
- ZIEBELL H., CARR J. P., 2009. *Effects of dicer-like endoribonucleases 2 and 4 on infection of Arabidopsis thaliana by cucumber mosaic virus and a mutant virus lacking the 2b counter-defence protein gene.* J. Gen. Virol. 90, 2288–2292.
- ZIEBELL H., CARR J. P., 2010. *Cross protection: a century of mystery.* Adv. Virus Res. 76, 211–264.