

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS
AUGALŲ FIZIOLOGIJOS IR MIKROBIOLOGIJOS KATEDRA

Jurgita Rimkevičiūtė

DIRVOŽEMIU PLINTANTYS VIRUSAI

BAIGIAMASIS MAGISTRINIS DARBAS

Darbo vadovai:

habil. dr. J. B. Staniulis

dr. Steen Lykke Nielsen

VILNIUS
2007

TURINYS

TURINYS.....	1
SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS.....	2
ĮVADAS.....	3
I LITERATŪROS APŽVALGA.....	5
1.1 Augalų virusai.....	5
1.2 Tobra genties virusai.....	6
1.2.1 Tobravirusų genomo struktūra.....	6
1.2.2 Tabako garbanotosios dryžligės viruso savybės.....	8
1.2.3 TRV genomas, koduojami baltymai.....	9
1.2.4 TRV augalai-šeimininkai, paplitimas, identifikavimas.....	13
1.3 Pomovirusai.....	16
1.3.1 Bulvių viršūnės kuokštiškumo virusas.....	17
1.3.2 PMTV genomo savybės.....	17
1.3.3 PMTV augalai-šeimininkai ir vektorius.....	19
1.4 TRV ir PMTV panašumai bei skirtumai.....	24
II MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI.....	25
2.1 Medžiagos	25
2.1.1 Reagentai.....	25
2.1.2 Oligonukleotidiniai pradmenys.....	25
2.1.3 Buferiai ir tirpalai.....	26
2.2 Tyrimo metodai.....	27
2.2.1 Augalų – indikatorių metodas.....	27
2.2.2 Elektroninės mikroskopijos metodas.....	27
2.2.3 Imunofermentinė analizė.....	28
2.2.3.1 Tiesioginio dvigubo sumuštinio ELISA metodas(DAS-ELISA).....	28
2.2.4 Totalinės RNR išskyrimas.....	28
2.2.5 Atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandininė reakcija(AT-PGR).....	29
2.2.6 Serologiškai sugauto viruso atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandininė reakcija (angl. Immuno Capture Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, IC-AT-GR).....	31
2.2.7 DNR elektroforezė.....	31
2.2.7.1 Poliakrilamidinis gelis.....	31
2.2.7.2 Agarozinis gelis.....	31
2.2.8 TRV gryninimas ir koncentravimas (Taylor, 1998).....	32
2.2.9 Grybo <i>Spongospora subterranea</i> infektyvumas ir produktyvumas.....	33
2.2.9.1 Zoosporangių stebėjimas mikroskopu.....	33
2.2.10 PMTV plitimo greitis indikatoriniuose augaluose.....	34
III EKSPERIMENTŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	35
3.1 Augalų - indikatorių metodas.....	35
3.2 Elektroninė mikroskopija.....	37
3.3 TRV gryninimas.....	38
3.4 Imunofermentinė analizė (DAS-ELISA).....	39
3.5 Atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandininė reakcija.....	44
3.6 Serologiškai sugauto viruso atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandininė reakcija (angl. Immuno Capture Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, IC-AT-GR).....	46
3.7 Grybo <i>Spongospora subterranea</i> infektyvumas ir produktyvumas.....	47
3.8 PMTV plitimo greitis indikatoriniuose augaluose.....	53
IŠVADOS.....	66
SANTRAUKA.....	67
SUMMARY.....	68
PADĖKA.....	69
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	70

SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS

TRV – *Tobacco rattle virus*
PEBV – *Pea early browning virus*
PepRSV – *Pepper ringspot virus*
PMTV – *Potato mop-top virus*
TMV – *Tobacco mosaic virus*
vv RNR – Vienvijė RNR
dv RNR – Dvivijė RNR
EDTA – Etilendiamintetraacto rūgštis
TEMED – N,N,N'N' – tetrametiletildiaminas
ME – Merkapto etanolis
ORF – Atviro skaitymo rėmelis
NCR – Nekoduojanti sritis
sgRNR – Subgenominė RNR
CP – Apvalkalo baltymas
ELISA - Imunofermentinė analizė (enzyme linked immunosorbent assay)
CsTFA - Cezio trifluoracetatas
DIECA - Natrio dietilditiokarbamatas
PVP - Polivinilpirolidonas
Tris - 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis
UA – Uranilacetatas
RdRp – Nuo RNR priklausoma RNR polimerazė
TGB – Trigubas genų blokas
CRP – Cisteinu turtingas baltymas
EM – Elektroninė mikroskopija
MM – Mineralinės medžiagos

IVADAS

Tabako garbanotosios dryžligės virusas (*Tobacco rattle virus*, TRV) ir bulvių viršūnės kuokštiškumo virusas (*Potato mop-top virus*, PMTV) – tai labai panašūs dirvožemiu plintantys virusai. Abu jie yra vvRNR+ *Togaviridae* šeimos virusai. TRV priklauso *Tobravirus* genčiai, kurioje taip pat yra žirnių ankstyvojo parudavimo virusas (*Pea early browning virus*, PEBV). *Tobravirus*us platina *Trichodoridae* šeimos nematodai. PMTV priklauso *Pomovirus* genčiai, kurioje be PMTV yra ir kiti dirvožemyje gyvenančių grybų platinami virusai: *Beet soil-born virus*, *Beet virus Q*, *Broad bean necrosis virus*. Dirvožemiu plintantys virusai padaro daug žalos įvairioms kultūroms, sumažina jų derlių, suprastina jo kokybę, todėl yra labai svarbu surasti efektyvius su šiais patogenais kovos kelius bei būdus.

PMTV labai plačiai pasaulyje paplitęs virusas. Tai lazdelės formos, vienviję RNR turintis virusas. Kovos priemonės su PMTV virusu yra nepakankamos ir neefektyvios. PMTV gana greitai plinta indikatoriniuose augaluose. Taip pat manoma, kad jo plitimo greitis gali būti spartus ir natūraliame šeimininke – bulvėje (*Solanum tuberosum* L.).

Šiuo metu vienas iš pagrindinių tikslų – sustabdyti PMTV greitą plitimą. Plitimo sustabdymui gali padėti kova su viruso vektoriumi (pernešėju). Todėl šiame darbe didelis dėmesys buvo skiriamas viruso vektoriui – *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh. – kuris pats yra rimtas bulvių patogenas, sukiantis šašų pavidalo miltligę bulvėse (Makarainen ir kt., 1994). Darbe buvo siekiama kuo daugiau išsiaiškinti šio vektoriaus biologiją, gyvybiškumą, produktyvumą bei infektyvumą.

PMTV bulvių gumbuose sukelia tokius pažeidimus kaip rudas ar nekrotines dėmes, žiedus, lankus. Tačiau vizualiai nustatyti, ar tai yra būtent šis minėtas virusas, yra sudėtinga, nes analogiškus simptomus sukelia ir kitas šiame darbe tyrinėjamas virusas – *Tobacco rattle virus*. Tai taip pat dirvožemiu plintantis virusas, kuris priklauso *Tobravirus* genčiai. Tai lazdelės pavidalo su kanalu viduje virusas, kuris yra platinamas *Paratrichodorus* ar *Trichodorus* gentims priklausančių nematodų.

PMTV ir TRV morfologinių savybių tyrimui bei identifikacijai buvo naudojami įvairūs tyrimo metodai (EM, ELISA, AT-PGR, vieno žingsnio AT-PGR, IC- AT-PGR).

Darbas buvo atliktas Botanikos Instituto Fitovirusų laboratorijoje, bei Aarhus Universitete Žemės ūkio mokslų fakultete Augalų apsaugos departamente Danijoje (Aarhus University, Faculty of Agricultural Science, Department of Plant Pathology).

Darbo vadovai: habil. dr. J. B. Staniulis ir dr. Steen Lykke Nielsen

Darbo tikslas: išskirti, identifikuoti ir palyginti biologines dviejų dirvožemiu plintančių virusų savybes.

Uždaviniai:

- nustatyti TRV ir PMTV virusų augalų šeimininkų spektrą bei pažeidžiamų augalų būdingus simptomus;
- identifikuoti virusus ELISA bei keliais skirtingais PGR metodais. Palyginti šiuos metodus bei nustatyti, kuris iš jų yra efektyvesnis ir jautresnis kiekvienam virusui;
- išgryninti TRV, nustatyti jo morfologines savybes bei palyginti gautus rezultatus su literatūroje pateiktais duomenimis;
- nustatyti PMTV plitimo greitį skirtinguose indikatoriniuose augaluose ir nustatyti jo vektoriaus – *Spongospora subterranea* zoosporangių produkavimo trukmę;

I. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 AUGALŲ VIRUSAI

Virusai – tai obligatiniai ląstelės parazitai, kurie turi pagrindines gyvų organizmų savybes:

1. sudaryti iš baltymų, nukleorūgščių, lipidų ir angliavandenių;
2. patekęs į jam tinkamą šeimininką, virusas gali daugintis;
3. jo sudėtyje randama nuo vieno iki kelių šimtų genų.

Taip pat virusai pasižymi savybėmis, būdingomis negyvam organizmui: jie gali būti kristalizuojami, neturi savo medžiagų apykaitos.

Virusai turi tik vienos rūšies nukleorūgštį: RNR arba DNR. Jie neturi užkoduotos informacijos apie baltymų sintezės mechanizmus, todėl jie visiškai priklauso nuo šeimininko. Taigi, viena iš svarbiausių virusų funkcijų - užkrėsti naujas ląsteles ir iškęsti nepalankias sąlygas, kurių nepakelia ląstelė – šeimininkė.

Virusai susideda iš baltyminių dalelių – kapsidės ir vidinės šerdies, kuri sudaryta iš nukleorūgšties ir šiek tiek (dažniau 1 – 5 % viso kiekio) baltymų, kurių dauguma reikalingi vos tik virusui įsiskverbus į ląstelę.

Pats stabiliausias viruso komponentas – nukleorūgštis. Nukleorūgštis sudaro nuo 1 % iki 46 % viruso masės, ir gali būti dviejų tipų: DNR arba RNR. Kad DNR ir RNR yra atitinkamų virusų genetinė medžiaga, patvirtino Frenkelis – Konratas (Frankel – Conrat ir Singer, 1957).

Virusų grupės pagal genetinę medžiagą:

- 1) DNR virusai. Nukleorūgštis gali būti: dvivija (dv) ir vienvija (vv);
- 2) RNR virusai (dauguma augalų virusų). Jie būna:
 - vienviją RNR turintys virusai. Pagal replikaciją ir transkripciją skirstoma:
 - a) plus grandinės – transliacija vyksta tiesiogiai;
 - b) minus grandinės – transliacija tiesiogiai nevyksta. Pirmiausia turi būti sintetinama plus grandinė.
 - dviviją RNR turintys virusai (Matthews, 1992).

Augalų virusuose maždaug 90 % vyrauja RNR virusai, dažniausiai aptinkama vvRNR. Yra identifikuota keletas virusų, kurių pagrindinė genetinė medžiaga yra DNR, bet yra randamas ir nedidelis kiekis RNR. 1 lentelėje yra pateiktas virusų paplitimas pagal turimą genetinę medžiagą.

1 lentelė. Virusų pasiskirstymas pagal genomą (Zaitlin ir kt., 1987).

	Virusų skaičius	Virusų kiekis procentais
Plius vvRNR ((+) vvRNR)	484	76,6
Minus vvRNR ((-) vvRNR)	82	13,0
dvRNR	27	4,3
dvDNR	26	4,1
dvDNR	13	2,0

Daugelis virusų, kurie turi vvRNR turi specifines sekas 3' (poliadenilinių traktų; į tRNR panašią struktūrą) ir 5' (kepurėlė) galuose.

5' kepurė. Ji skiriasi tarp virusų, nes kai kurie komponentai nėra metilinti. Šią struktūrą turi tobavirusai, tobamovirusai, bromovirusai, carmovirusai, furovirusai bei potexvirusai.

3' poly A traktas. Poliadenilinta seka buvo identifikuota kai kuriuose augalų virusuose, kurie turi RNR. Šio trakto ilgis gali varijuoti. Pavyzdžiui, *Clover yellow potexvirus* RNR poly A trakto ilgis yra 75-100 A liekanų, o *Cowpea mosaic comovirus* (CPMV) – 25-170.

RNR virusai turi RNR polimerazę, kuri yra koduojama nuo didelės viruso genomo dalies, todėl RNR pati viena gali infekuoti ląstelę ir vykdyti savireplikaciją.

Daugiausiai augalų virusai turi genomą, sudarytą iš vvRNR. Virusuose, kuriuose aptinkamas tokio tipo genomas, pasitaiko, kad nevisada guaninas aptinkamas poroje su citoziniu ar adeninas su uracilu. Daugelis virusų rodo labai didelį nukrypimą nuo bazių porų susiformavimo taisyklės.

1.2 TOBRA GENTIES VIRUSAI

Tai (+) vvRNR turintys augalų virusai. Šiai grupei priklauso tik trys virusai: Tabako garbanotosios dryžligės virusas (*Tobacco rattle virus*, TRV), *Pea – early browning virus* (PEBV), *Pepper ringspot virus* (PepRSV). Tobavirusai yra labai skirtingi. Jie skiriasi vienas nuo kito šeiminkais, serologinėmis savybėmis ir galimybėmis suformuoti įvairius pseudorekombinantinius izoliatus (MacFarlane ir kt., 1999).

1.2.1 Tobavirusų genomo struktūra

Daugumos tobavirusų genomas suskirstytas į segmentus. Kiekvienas genomo segmentas turi 5' metil guanozino kepurę ir 3' į tRNR panašią struktūrą (Lubica, 2003).

Tobravirusai turi (+) vvRNR genomą, sudarytą iš dviejų segmentų. TRV buvo pirmasis virusas, kurį tyrinėjant buvo nustatyta, kad genomą sudarytas iš kelių dalių. TRV turi dvejopas daleles. RNR, esanti ilgesnėje dalelėje, gali replikuotis viena, bet negali suformuoti virusinių dalelių. Trumpesnėje dalelėje RNR negali iš viso replikuotis. Buvo nustatyta, kad ilgoji dalelė koduoja fermentą, kuris yra reikalingas viruso RNR replikacijai.

RNR–1. TRV ir kitų tobravirusų RNR–1 yra 6791 nt ilgio. Ji turi 4 atvirus skaitymo rėmelius (ORF):

1. ORF, koduojantis 134 kDa baltymą,
2. ORF, koduojantis 194 kDa baltymą,
3. ORF, koduojantis 29 kDa baltymą,
4. ORF, koduojantis 16 kDa baltymą.

Tarp 194 kDa ir 29 kDa skaitymo rėmelių yra randamas vienas intergeninis regionas. 3' gale yra nekoduojanti sritis, kurios ilgis 255 nt.

RNR–1 negali būti aminoacilinta, nes turi į tRNR panašią struktūrą 3' gale.

RNR–2. Tobravirusai skiriasi nuo kitų virusų savo RNR–2 dideliu variabilumu. RNR–2 dydis varijuoja ne tik tarp pačių tobravirusų, bet ir tarp giminingų virusų. Ji varijuoja tobravirusuose nuo 1800 nt iki 4000 nt. TRV kamieno PSG 3' gale 497 nt yra identiškai RNR–1 3' galui. Dalis ORF, kuri koduoja 16 kDa baltymą, taip pat yra aptinkama RNR–2 3' gale, kuri yra atsakinga už apvalkalo baltymo kodavimą. RNR–2 TRV TCM kamiene turi ORF, koduojantį 29 kDa baltymą, kuris nėra panašus į nei vieną geną RNR–1 ar RNR–2. RNR–2 5' galas turi 8 AUG kodonus.

Tobravirusų judėjimo baltymas yra 29 kDa dydžio. Jis yra giminingas tobamovirusų 30 kDa judėjimo baltymui. Buvo išaiškinta, kad judėjimo mechanizmas iš ląstelės į ląstelę yra labai panašus. Virusai juda iš ląstelės į ląstelę, kai dar nėra apvalkalo baltymo. Virusų judėjimo baltymas susijungia su viruso nukleorūgštimi ir suformuoja ribonukleoproteino kompleksą, kuris transportuoja virusą per plazmodezmą į gretimą ląstelę (Lubica, 2003).

PEBV baltymus koduojantis 4 ORF yra mažesni nei TRV. Abiejuose virusuose kai kuriuose baltymuose yra aptinkami 2 kartus pasikartojantis motyvas – cisteinas/histidinas. Tobravirusuose yra identifikuotas genas, kuris produkuoja “cinko pirštų” baltymą. Kai kuriuose TRV izoliatuose (PSG, SYM ir TCM) buvo rastas konservatyvus cinko pirštų motyvas (Sudarshana ir Berger, 1998).

TRV apvalkalo baltymas gali suformuoti stabilus agregatus.

Tobravirusų 2b baltymas yra jungiančioji dalis tarp viruso paviršiaus dalelių ir vektoriaus nematodo burnos dalies. (Vassilakos, 2001).

RNR–2 rekombinacija. Visų izoliatų RNR–1 ir RNR–2 turi identišką seką 3' gale nekoduojamajame regione. Daugelio tobnavirusų RNR–2 yra rekombinantinė ir turi tiek koduojamas, tiek nekoduojamas sekas 3' gale. Šios sekos yra gautos iš RNR–1. Rekombinantiniai regionai gali būti ilgesni nei 1 kb. Jie gali koduoti visą ar tik dalį RNR–1 genų. Rekombinacija gali vykti tarp dviejų skirtingų tobnavirusų. Pavyzdžiui, Nyderlanduose viename lauke, kuriame augo svogūniniai augalai, buvo aptikta 30 % tokių tobnavirusų (TRV/PEBV rekombinantai) (MacFarlane, 1999).

Buvo pastebėta, kad kai kurie TRV izoliatai turi sutrumpėjusią RNR–2. Ji praranda nedidelę savo dalį, kai virusas yra pernešamas mechaniniu būdu. Manoma, kad tai Di RNR arba defektinė RNR. Tai defektiniai interferuojantys virusai. Toks reiškinys gana dažnai aptinkamas tarp RNR turinčių augalų virusų (Hernandez ir kt., 1996).

Nekoduojamas regionas aptinkamas ir RNR–2 5' gale, kuris varijuoja nuo 470 iki 710 nt ilgio skirtinguose tobnavirusuose.

Kai kuriuose TRV kamienuose yra identifikuota subgenominė RNR (sgRNR), kuri gali būti sudaryta iš 3 dalių: RNR–3, RNR–4 ir RNR–5. Daugiausiai žinoma apie RNR–3, kurios ilgis siekia 1,6 kb. Ji atsakinga už 30 kDa baltymo sintezę. Kitoje literatūroje teigiama, kad šis baltymas priklauso RNR-1 arba RNR–2 (Cornelissen ir kt., 1986). Tobnavirusai sintetina sgRNR, kuri yra transliuojama į skirtingus viruso baltymus (Cornelissen ir kt., 1986). Seka GCAUA yra dalis subgenominio promotoriaus, kuri randama daugelyje tobnavirusų ORF. Dažnai jis aptinkamas „stiebas – kilpa“ struktūroje. ORF 1 randamas 586 nt – 614 nt pozicijoje, ORF 2 – 1461 nt – 1465 nt, ORF 3 nėra visai randama. Tarp šių dviejų ORF yra aptinkamas intergeninis regionas (Uhde ir kt., 1998).

1.2.2 Tabako garbanotosios dryžligės viruso savybės

MORFOLOGIJA. Tabako garbanotosios dryžligės virusas priklauso *Tobravirus* genčiai. Tai lazdelės formos virionas, neturintis lipidinio apvalkalo. Nukleokapsidė tiesi ir lygi. Virusų ilgis varijuoja priklausomai nuo izoliato. Dažniausiai pasitaiko dviejų dydžių dalelės:

- L – 180 – 215 nm;
- S – 46 – 115 nm.

Viriono centre yra matomas kanalas, kurio diametras 4 – 5 nm. TRV būdinga spiralinė simetrija.

Jis stabilus plačiame pH intervale. TRV atsparus daugeliui organinių tirpiklių, bet jautriai reaguoja su medžiagomis, kuriose yra EDTA (Faugnet ir kt., 2005).

BALTYMAI IR LIPIDAI. Viriono sudėtyje aptinkama 0 % lipidų, tačiau baltymų kiekis sudaro net iki 95 %. Yra identifikuotas vienas struktūrinis baltymas – tai kapsidės baltymas. Jo dydis varijuoja nuo 21 kDa iki 23 kDa (Bergh ir kt., 1985). Virusas koduoja ir nestruktūrinius baltymus. Šių baltymų dydis labai įvairus. Baltymai varijuoja skirtinguose TRV izoliatuose. Jų funkcijos yra įvairios: dalyvauja replikacijoje, viruso pernešime, viduląsteliniame transporte. Dauguma baltymų savo sudėtyje turi cisteino-histidino motyvus, Zn prijungiančius motyvus. Visi baltymai turi bazinėmis amino rūgštimis turtingą C galą (Lui ir kt., 2002).

GENOMAS. TRV genomas sudarytas iš dviejų viengrandės linijinės RNR segmentų. Šios RNR yra inkapsuliuotos į kelias 190 ir 45 – 115 nm ilgio spirales daleles. Nukleorūgštis virione sudaro 5 % visos masės. Bazių pasiskirstymas virusinėje RNR dalelėje (Faugnet C. M. ir kt., 2005):

- Guaninas (G) – 24 – 25 %;
- Adeninas (A) – 26 – 29 %;
- Citozinas (C) – 17 – 18 %;
- Uracilas (U) – 29 – 32 %.

TRV būna 2 tipų (Robinson, 1992):

- ✓ M – susideda iš 2 RNR ;
- ✓ MN – turi tik RNR–1.

M tipo virusams būdinga tai, kad šio viruso infekuoti augalai nerodo jokių pakitimų, simptomų, tačiau augaluose gali būti nustatoma didelė viruso koncentracija. Šio viruso sukelti bulvių pažeidimai buvo rasti Nyderlanduose, Belgijoje, Švedijoje, Didžiojoje Britanijoje, Vokietijoje (Robin, 2004).

NM tipo viruso pagrindinis bruožas - virusas negali būti perduodamas nematodų pagalba. Šio tipo virusai yra praradę RNR–2 ir neprodukuoja apvalkalo baltymo. Dėl šios priežasties TRV yra sunku identifikuoti imunodiagnostiniais metodais. Taip pat NM izoliatai neprodukuoja virusinių dalelių, tačiau dalyvauja infekcijoje, replikacijoje, viruso pernešime ir simptomų ekspresijoje (Kawchuk ir kt., 1996).

1.2.3 TRV genomas, koduojami baltymai

TRV turi 2 RNR tipus: RNR–1 ir RNR–2. Virusso susidaryme yra reikalingos abi RNR.

RNR–1. RNR–1 koduoja 4 nestruktūrinius baltymus:

- **134 kDa** baltymas, kuris baigiasi opal stop kodonu ir **194 kDa** baltymas. Abu šie baltymai dalyvauja replikacijoje;

- **29 kDa** baltymas (P1a) dalyvauja viruso viduląsteliniame transporte;
- **16 kDa** (P1b) yra potranskripcinis genų nutildymo supresorius (Robin, 2004).

RNR–1 yra didesnė ir konservatyvesnė nei RNR–2, turi konservatyvią genų organizaciją. RNR–1 (6500 nt) susideda iš 4 ORF (Hernandez ir kt., 1996). 1 ir 2 ORF koduoja baltymus, kurių molekulinės masės yra **134 kDa** ir **194 kDa** (Liu ir kt., 2002). Šie abu produktai yra ekspresuojami tiesiogiai nuo genomines RNR. Jie dalyvauja virusinės RNR replikacijoje. Didžiausias ORF turi polimerazinius, helikazinius bei metil transferazinius domenų (Crosslin ir kt., 2003). Trečiasis ORF koduoja **29 kDa** baltymą, kuris yra atsakingas už viruso judėjimą iš ląstelės į ląstelę. Ketvirtasis ORF koduoja cisteinu turtingą **16 kDa** baltymą (Liu ir kt., 2002). Šis baltymas yra koduojamas nuo viruso genomo 3' galo (Lubica, 2003).



1 pav. TRV PpK20 kamieno RNR – 1 struktūra (MacFarlane, 2003).

1 ORF baigiasi ties 609 nt. 2 ORF prasideda kodonu ATG 846 nt ir baigiasi 1604 nt, tai atitinka 252 amino rūgščių polipeptidą. 3 ORF prasideda nuo metionino (ATG) kodono 1629 nt pozicijoje ir koduoja baltymą, sudarytą iš 141 amino rūgščių. Šis atviro skaitymo rėmelis baigiasi ties 2054 nt.

Replikazių genai. RNR–1 5' proksimaliniai genai koduoja 134 kDa baltymą, kuris turi amino rūgščių motyvų, panašių į metiltransferazių ir helikazių baltymus. Pirmame skaitymo rėmelyje yra helikazės genas ir genas, kuris koduoja baltymą, panašų į nuo RNR priklausomą RNR polimerazę (RdRp). *In vitro* buvo atlikti transliacijos eksperimentai, kurie parodė, kad šis genas yra ekspresuojamas nuo viso ilgio genomines RNR–1. Transliacija vykdoma per helikazės geno terminalinį kodoną (helikazės transliacijos terminacijos kodonas yra UGA (opal)). Svarbų vaidmenį šioje srityje atlieka susitelkusios triptofano ir cisteino liekanos. Replikazė yra 194 kDa dydžio, varijuoja priklausomai nuo skirtingų TRV izoliatų. Pilnas helikazės/RNR polimerazės (replikazės) genas užima apie 75 % visos RNR–1 (MacFarlane, 1999).

Su judėjimu susiję baltymai. RNR–1 polimerazės genas koduoja 29 kDa baltymą, kuris reikalingas viruso pernešimui iš ląstelės į ląstelę. Šis baltymas vadinamas judėjimo baltymu.

Cisteinu turtingas genas. RNR–1 3' gale esantis proksimalinis genas koduoja 16 kDa baltymą. Šio baltymo N galas yra turtingas cisteinu, o C gale randama tik keletas cisteinų. Cisteiniais turtingi baltymai yra koduojami daugelio augalų virusų. Jie svarbūs viruso genų ekspresijoje ir plitimui per sėklas (MacFarlane, 1999).

Manoma, kad viruso infektyvumui didesnę vaidmenį vaidina RNR–1. Šis procesas susijęs su infekcijos sukėlėjo replikacija. RNR–2 viena nėra infektyvi, bet kada inokuliate ji atsiduria kartu su RNR–1, prasideda dviejų dalelių produkcija. RNR–1 gali infekuoti augalą, nesant RNR–2 (Hernandez ir kt., 1996). Tada ji sukelia nedaugybines infekcijas – NM tipo virusas. Šiuo atveju virusinės dalelės nesusidaro. Daugybines M tipo infekcijos sukeliamos, kai genome yra randamos abi RNR rūšys. Šiuo atveju TRV virusinės dalelės susidaro.

RNR–1 5' gale randama nekoduojanti sritis (NCR), kuri yra 202 nt dydžio (MacFarlane, 1999). Ji yra gana identiška tarp TRV izoliatų (44 – 46 %). Nekoduojančioje srityje yra randamos tiesioginės pasikartojančios sekos, kurios sudarytos iš 22 nt. Šios sekos yra aptinkamos ir RNR–2. Abiejose TRV RNR–1 ir RNR–2 3' gale NCR panašumas siekia 73 % lyginant su PEBV viruso NCR (MacFarlane, 1999).

RNR–1 pagrindinės funkcijos (Carmen ir kt., 1996, MacFarlane, 1999):

- turi svarbią informaciją, reikalingą RNR replikacijai;
- yra reikalinga viruso judėjimui iš ląstelės į ląstelę;
- kaupia informaciją apie RNR–2 koduojamus kapsidės baltymus;
- indukuoja replikazę, kuri dalyvauja RNR–2 replikacijoje;
- atsakinga už abiejų RNR inkapsidaciją.

RNR–2. RNR–2 koduoja struktūrinį baltymą ir 2 nestruktūrinius baltymus (P2b ir P2c). P2b ir P2c yra reikalingi viruso pernešimui. Atlikus hibridizaciją, buvo nustatyta, kad TRV RNR–2 labai mažai panaši į RNR–1 savo nukleotidų seka. RNR–2 3' galas yra homologiškas RNR–1 maždaug nuo 400 nt iki 1100 nt ilgio (MacFarlane, 1999). Šis ilgis taipogi priklauso nuo TRV kamieno.

RNR–2 uracilo nukleotidas sudaro didžiausią procentinę dalį šioje nukleorūgštyje. 2 lentelėje yra pateikti duomenys apie nukleotidų pasiskirstymą RNR–2, atviro skaitymo rėmeliuose bei kodono trečioje padėtyje.

2 lentelė. Nukleotidų santykis RNR – 2 (Bergh ir kt., 1985)

	U%	C%	A%	G%
TRV RNR-2	32	18	26	24
ORF	29	23	23	25
Kodono 3-ioji padėtis	42	16	18	25

RNR–2 ilgis varijuoja nuo 1800 nt iki 4000 nt, priklausomai nuo skirtingų TRV izoliatų. Variabilumas priklauso nuo RNR–2 koduojamo 2 geno specifinių sekų ir nuo RNR–1 3' gale esančių sekų.

RNR – 2 atsakinga už 3 baltymų kodavimą:

- apvalkalo baltymą (CP), kurio molekulinė masė 23 kDa;
- 2b (molekulinė masė 40 kDa). Buvo nustatyta, kad būtent 2b baltymai dalyvauja viruso pernešime;
- 2c (molekulinė masė 32,8 kDa) (MacFarlane ir kt., 1999).



2 pav. TRV PpK20 kamieno RNR – 2 struktūra (MacFarlane, 2003).

CP genas yra proksimalinis RNR–2 5' genas. Jis nėra transliuojamas nuo genomines RNR, tačiau transkribuojamas nuo sgRNR, todėl, kad 5' gale nekoduojamojoje srityje yra 7 translacijos iniciacijos kodonai (AUG). Buvo išanalizuota CP geno sgRNR. Šios sgRNR promotorius gali turėti stiebas – kilpa struktūrą. sgRNR yra konservatyvi dydžiu, bet ne struktūra. Ji yra lokalizuota iškart po motyvo GCAUA, kurio dalis (AUA) yra sgRNR 5' galas. Mutagenzės eksperimentu buvo nustatyta, kad struktūra stiebas – kilpa yra svarbi CP ekspresijai. Kita struktūra – GCAUU (panašus motyvas) – yra aptinkama daugelyje RNR–2 koduojamų genų. Yra manoma, kad šie genai taipogi yra ekspresuojami nuo sgRNR. Tačiau ši hipotezė dar nėra patvirtinta (MacFarlane, 1999).

Apvalkalo baltymo C galas yra didelis. Jis yra labai imunogeniškas. Manoma, kad būtent ši dalis yra atpažįstama viruso vektorių ir vaidina svarbų vaidmenį TRV pernešimui. Tobravirusų CP geno C gale, esantis domenas tarp 20 ir 30 amino rūgščių, pasižymi didžiausiu antigeniškimu (MacFarlane, 2003). Šis domenas gali sąveikauti su kitais viruso ar net nematodo faktoriais, dėl to palengvina bei pagerina viruso pernešimą. Buvo nustatyta, kad nestruktūriniai genai, kurie lokalizuoti RNR–2, dalyvauja viruso pernešimo procese. Kai kurie izoliatai (TRV PpK20) yra silpnai pernešami, manoma, kad tai yra susiję su 15 amino rūgščių delecija CP geno C gale, tačiau delecija 2c gene neturi įtakos viruso pernešimui ar infekcijai (MacFarlane, 2003). RNR–2 baltymo C galas yra mažiau konservatyvus nei N galas.

Daugelis TRV kapsidės baltymo karboksiliniame gale iš 7 galinių amino rūgščių 5 yra prolinas. Kapsidės baltymo dydis yra maždaug 23 000 Da (Bergh ir kt., 1985).

2b geno koduojami baltymai tarp tobravirusų yra homologiški 45 %, o 2c geno baltymas – 9 % (MacFarlane, 2003). 2b geno baltymas svarbus virusų pernešimui nematodais (MacFarlane ir kt., 1999).

Kai kurie TRV izoliatai RNR–2 3' gale turi 16 kDa baltymo geno dalį, gautą iš RNR–1. Šio baltymo sintezę nutraukia UGA – stop kodonas, o izoliatai PSG šį kodoną išstumia AAA kodonas (Uhde ir kt., 1998).

RNR–2 3' galo 140 terminalinių nukleotidų sudaro panašią į tRNR struktūrą, kuri turi 2 plaukų segtukų kilpas ir pseudomazgą. TRV RNR–2 gali būti adenilinta 3' gale. Tačiau skirtingai nuo daugelio augalų virusų ši struktūra panaši į tRNR negali būti aminoacilinta (MacFarlane, 1999).

RNR–2 5' gale randama kepurėlė, o RNR–1 kepurėlė dar nėra aptikta. Poly A regionas nėra aptinkamas abiejuose RNR tipuose. TRV 3' galas tiek RNR–1, tiek ir RNR–2 nėra poliadenilintas ir aminoacilintas.

RNR–2 709 nt 5' gale yra nekoduojama sritis. 115 nt – 146 nt regionas – tai konservatyvus regionas, kuris aptinkamas daugelyje izoliatų (Uhde ir kt., 1998).

Kai kuriuose TRV izoliatuose buvo aptiktas ORF, kuris atsakingas už 9 kDa koduojamą baltymą. Šis ORF aptinkamas tarp ORF, koduojančio CP ir ORF, koduojančio 29 kDa baltymą. Kai kuriuose izoliatuose šis ORF gali būti pamestas (Henze ir kt., 2000).

1.2.4 TRV augalai-šeimininkai, paplitimas, identifikacija

AUGALAI – ŠEIMININKAI. SIMPTOMAI. Natūraliomis sąlygomis TRV gali infekuoti daugiau kaip 100 augalų rūšių, įskaitant ir svarbius kultūrinius augalus, tokius kaip bulves, tabaką, kardelius, tulpes, cukrinius runkelius, pipirus. Taip pat infekuoja apie 400 augalų rūšių laboratorinėmis sąlygomis (Dale ir kt., 2004). Šis virusas sukelia įvairias ligas, kurios turi didelį poveikį ekonomikai. Bulvėse šis virusas sukelia gyslų pažeidimus ir įvairius pakitimus. Kartais TRV sukelia stiebo pakitimus – stiebas tampa dėmėtas (Dale ir kt., 2000).

Atlikus tyrimus, buvo palygintos įvairios medžiagos sveikų ir TRV infekuotų augalų. Gauti rezultatai pateikti 3 lentelėje (Dale ir kt., 2000).

3 lentelė. Įvairių medžiagų palyginimas sveikuose ir TRV infekuotuose augaluose (Dale ir kt., 2000)

	Sveikas augalas	TRV infekuotas augalas
Drėgnumas (%)	21,77	18,85
Gliukozė (mg/100g FDM)	2,79	2,44
Fruktozė (mg/100g FDM)	0,85	0,87
Sacharozė (mg/100g FDM)	0,42	0,56
Glikoalkolidai (mg/100g FDM)	26,7	17,4

FDM = mg/100g sauso organinio svorio

Infekuotuose augaluose sacharozės kiekis padidėja. Yra manoma, kad cukraus metabolizmas vaidina svarbų vaidmenį augalų programuotoje ląstelės žūtyje. Pasikeitusi sacharozės koncentracija TRV infekuotuose augaluose gali būti susijusi su apsisaugojimu nuo infekcijos ir su pasikeitimais karbohidratų sintezėje (Dale ir kt., 2000).

Viruso sukelti simptomai augaluose varijuoja priklausomai nuo sezono.

Diagnostinės rūšys:

Chenopodium amaranticolor, *C. quinoa*, *Cucumis sativus* – nekrotinės ir chlorotinės vietinės žaizdos. TRV sukelia vietines nekrotines žaizdas inokuliuotame indikatoriniame augale *C. quinoa*. Simptomai pasirodo praėjus 4 dienom po inokuliacijos. Visas augalas gali nekrotizuoti praėjus maždaug 1 ar 2 savaitėms po užkrėtimo (Mumford ir kt., 2000).

Phaseolus vulgaris, *Pisum sativum*, *Vicia faba* – nekrotinės vietinės pažaidos, dažnai pasitaiko besimptomė infekcija.

Nicotiana tabacum – sisteminė nekrozė, žiediškas dėmėtumas, margumas.

Virusui jautrūs augalai šeiminkai: *Amaranthus caudatus*, *Beta vulgaris*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. album*, *C. quinoa*, *Cucumis sativus*, *Narcissus pseudonarcissus*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. sylvestris*, *N. tabacum*, *Phaseolus vulgaris*, *Stellaria media*, *Trifolium repens*, *Vicia faba*.

Nejautrūs augalai šeiminkai: *Citrus medica*, *Fragaria vesca*, *Zea mays*, *Datura metel*.

Šeimos, kurias infekuoja TRV: *Amaranthaceae* (3), *Apocynaceae* (1), *Boraginaceae* (1), *Campanulaceae* (1), *Chenopodiaceae* (6), *Cruciferae* (7), *Cucurbitaceae* (3), *Hyacinthaceae* (1), *Leguminosae-Papilionoideae* (11), *Liliaceae* (1), *Linaceae* (1), *Solanaceae* (16).

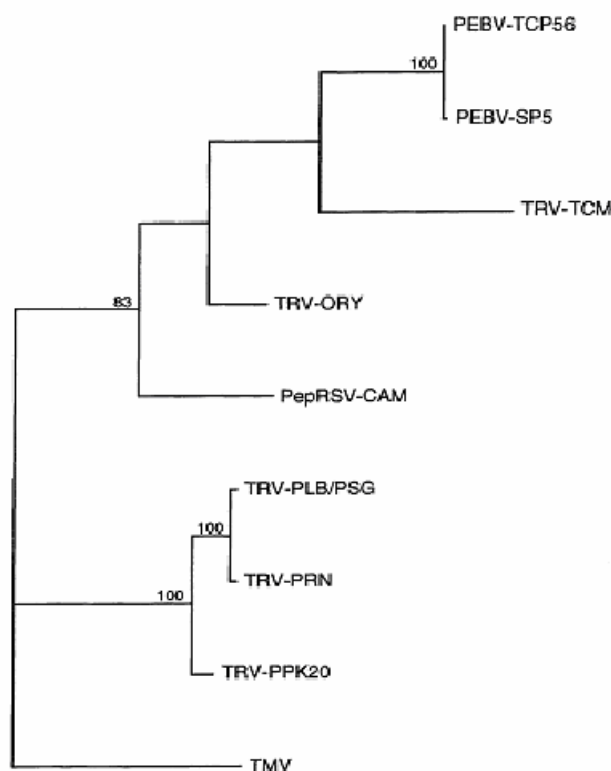
GEOGRAFINIS PAPLITIMAS. Plačiai paplitęs visoje Euroazijoje, Amerikoje, Naujojoje Zelandijoje, Australijoje (Cooper ir Asher, 1988).

PERNEŠIMAS. Virusas plinta mechaniškai inokuliuojant, skiepijant, tačiau labiausiai šis virusas plinta vektorių pagalba. Juos platina nematodai: *Paratrichodorus allius*, *P. anemones*, *P. christiei*, *P. nanus*, *P. pachydermus*, *P. teres*, *Trichodorus minor*, *T. primitivus*, *T. viruliferus*. Kiekvienas izoliatas yra pernešamas tam tikro vektoriaus (Visser ir Bol, 1999).

Pernešimo procesui labai svarbi yra viruso ir vektoriaus tarpusavio sąveika. Turi būti tam tikras sąveikos specifiškumas, kad vieną virusą galėtų pernešti keli nematodai arba kad skirtingi viruso izoliatai galėtų dalintis tais pačiais vektoriais. Buvo atrasta koreliacija tarp tobravirusų izoliatų ir jų vektorių – nematodų. Tai yra specifinis segmentas, kurį atpažįsta nematodas (Visser ir Bol, 1999). Atlikus magnetinį branduolinį rezonansą, buvo nustatytas mobilus segmentas, lokalizuotas apvalkalo baltymo subvienete C gale. Būtent šį mobilų elementą ir atpažįsta vektorius. Šio elemento pagrindinė funkcija – dalyvauti viruso pernešime vektoriaus pagalba.

Yra iškelta hipotezė, kad tobnavirusų pernešimui yra reikalingi pagalbiniai baltymai, kurie aptinkamas infekuoto augalo lapuose arba šaknyse. Šių baltymų ekspresija koreliuoja su CP geno ekspresija. Šie baltymai sąveikauja su specifine vieta nematodo stemplėje (Visser ir Bol, 1999).

GIMININGUMAS. Analizuojant skirtingus TRV izoliatus buvo nubrėžtas filogenetinis medis pagal kapsidės baltymo amino rūgščių seką. Šis filogenetinis medis pateiktas 3 paveiksle. Buvo nustatyta, kad kai kurie izoliatai, kaip TRV ORY yra labiau giminingi kitiems tobnavirusams (PEBV-TCP56 ir PEBV-SP5 bei PepRSV-CAM) nei to paties TRV izoliatams (Sudarshana ir Berger, 1998).



3 pav. Tobnavirusų filogenetinis medis pagal kapsidės baltymo analizę (Sudarshana ir Berger, 1998).

TRV ORY yra kur kas giminingesnė *Tobacco mosaic virus* (TMV) nei kitiems TRV izoliatams. Pagal šį filogenetinį medį nustatyta, kad tobnavirusai sudaro du filogenetinius klasterius pagal kapsidės baltymą. TRV – ORY įeina į vieną klasterį kartu su PepRSV, TRV-CAM ir PEBV. TRV izoliatai: PPK20, PSG ir PRN yra filogenetiškai skirtingi lyginant su kitais tobnavirusų izoliatais. Šie izoliatai suformuoja atskirą subgrupę (Sudarshana ir Berger, 1998).

IDENTIFIKAVIMAS. Serologiniais metodais (tokiais kaip ELISA) ne visada įmanoma nustatyti TRV. Manoma, kad tai yra susiję dėl neapvilktos viruso RNR molekulės, t.y. trūksta viruso apvalkalo baltymo. Kadangi šio baltymo nėra, serologiniai metodai duos neigiamą rezultatą, nes šie metodai yra paremti būtent apvalkalo baltymo serologija.

Nukleorūgštimis paremti metodai (tokie kaip hibridizacija bei PGR) taipogi simptomų pasireiškimais ant indikatorinių augalų galima būtų pasinaudoti, siekiant atskirti bulvių viršūnės kuokštiškumo virusą (*Potato mop-top virus*, PMTV) nuo TRV.

1.3 POMOVIRUSAI

Pomovirus gentis turi daug (maždaug 180) virusų rūšių. Jų genomai sudaryti iš vvRNR molekulių, kurios dydis yra apie 10 kb. Ji yra transliuojama į polipeptidą, kuris proteolitiškai apdorojamas trijų viruso koduojamų proteinazių. Gali susidaryti iki 10 baltymų, kurių dauguma yra multifunkciniai. Vienas iš tokių baltymų yra pagalbinio komponento proteinazė (HC-Pro), kuri apsaugo save nuo kitų virusinių polipeptidų. Žinoma, kad ji dalyvauja RNR nutildymo supresijoje, genomo replikacijoje, viruso judėjime ir viruso pernešime vektorių pagalba.

Kapsidės dydis apie 22 kDa. Tai RNR virusai. Viriono skersmuo dažniausiai būna 20 nm. Aptinkami dviejų ilgių. Ilgis svyruoja nuo 150 nm iki 270 nm (Brunt ir Richardst, 1989).

Pomovirusai infekuojami platų spektrą augalų rūšių ir aptinkami visuose 5 kontinentuose.

PMTV paplitimas labai priklauso nuo kultūros tolerantiškumo, jautrumo, aplinkos sąlygų. Infekuotame augale simptomai dažniausiai pasireiškia, kai yra vėsu (5-15° C) (Brunt ir Richardst, 1989). PMTV labiau infektyvus, kai dirvos temperatūra yra 15-18 ° C, o simptomai labiau išryškėja, kai temperatūra yra ne didesnė nei 20° C (Brunt ir Richardst, 1989).

Dažniausiai pasitaikantys simptomai būna: geltonos arba chlorotinės dėmės. Tai išoriniai pažeidimai. Vidiniai pažeidimai pasireiškia rudais, nekrotiniais žiedais. Virusas gali būti pernešamas 26 rūšims iš 3 šeimų (Brunt ir Richardst, 1989). *N. debneyi*, *N. benthamiana* ir *N. tabaccum* rūšių augaluose virusas sukelia sisteminę reakciją. Tai pagrindiniai grybais plintančių virusų indikatoriai augalai.

Šios grupės virusus platina dirvožemio patogeniniai grybai. Kai kurie iš jų plinta savaime, natūraliai.

Šiuos virusus yra labai sunku kontroliuoti, todėl, kad virusai ilgai gali išgyventi vektoriaus ramybės sporų viduje. PMTV galima kontroliuoti, keičiant dirvos pH, jį mažinant iki pH 5, tai inhibuoja virusą, tačiau toks pH nenužudo viruso vektoriaus (Brunt ir Richardst, 1989). Galima taip pat reguliuoti viruso infektyvumą ir paplitimą Zn metalo komponentais (Brunt ir Richardst, 1989). Jei grybo sporas paveiksime formaldehidu arba pesticidais, kuriuose yra gyvsidabrio, tai galima sumažinti PMTV plitimą (Brunt ir Richardst, 1989).

Virusai augaluose dažniausiai aptinkami mažomis koncentracijomis. Šios grupės virusai augaluose aptinkami citoplazmoje ir parenchimos ląstelių vakuolėse.

1.3.1 BULVIŲ VIRŠŪNĖS KUOKŠTIŠKUMO VIRUSAS

PMTV žinomas nuo 1960 m., kai buvo aptiktas Šveicarijoje (Merz, 1989). 1997 metais buvo paskelbta, kad PMTV yra plačiai paplitęs virusas (Andersen ir kt., 2002).

PMTV padaro didelę žalą bulvių derliui. Sukelia vidinius ir išorinius pažeidimus jautriuose augaluose. Kai kurie augalai gali būti pakenkti, tačiau simptomai gali būti nematomi. PMTV yra vienas iš ekonomiškai žalingiausių virusų. Plinta grybo *Spongospora subterranea f.sp. subterranea* zoosporų pagalba. Tai vienas iš svarbiausių bulvių patogenų, kuris sukelia miltelių pavidalo birius šašiuksus ant augalo stiebo ir stiebagumbių.

MORFOLOGIJA. PMTV yra vamzdelio pavidalo, nelankstus 18 – 20 nm diametro ir 100 – 150 nm arba 250 – 300 nm ilgio virusas (Arif ir kt., 1995).

GENOMAS. PMTV sudarytas iš 3 (+) vvRNR: RNR-1 – 6 Kb, RNR-2 – 3,2 Kb ir RNR-3 – nuo 2,4 iki 3,1 Kb dydžio (Savenkov ir kt., 1999; Brunt ir Richardst, 1989).

BALTYMAI IR LIPIDAI. Virusiniai baltymai dažniausiai būna multifunkciniai, kurie atlieka skirtingus vaidmenis įvairiose augalų ligos stadijose. Jie sąveikauja vienas su kitu, taip pat ir su šeimininko molekulėmis, taip didindami savo aktyvumą. Tuo tarpu augalai turi daugybę mechanizmų, kurie trukdo viruso replikacijai ir jo plitimui.

Daugelis augalų virusų turi unikalų baltymų trigubą genų bloką (TGB), kuris sudarytas iš judėjimo baltymų. TGB palengvina viruso plitimą ir sukelia augalui – šeimininkui sisteminę infekciją (Savenkov ir kt., 1999, Pečenkova ir kt., 2004).

1.3.2 PMTV genomo savybės

PMTV sudarytas iš 3 (+) vvRNR.

RNR–1 yra 6043 nt. Ji yra konservatyvi ir koduoja baltymus, reikalingus replikacijai ir viruso plitimui. RNR-1 turi 2 ORF:

1. ORF 1 – 3909 nt ilgio. Jis koduoja 148 kDa replikazės baltymą, kuris turi metiltransferazinius ir helikazinius domenų. Šis baltymas susideda iš 1303 amino rūgščių. ORF 1 prasideda AUG kodonu 115 nt pozicijoje ir baigiasi UGA stop kodonu 4024 nt pozicijoje.

2. ORF 2, kuris randamas iškart po opal kodono. Jis baigiasi UGA (5551 nt) kodonu. Šis ORF atsakingas už sulieto baltymo kodavimą, kurio dydis yra 206 kDa (Savenkov ir kt., 1999). Jis yra labai panašus į RdRp, ir yra randamas kituose grybais plintančiuose virusuose (Pačenkova ir kt., 2004). RdRp seka yra labai svarbi virusų taksonomijoje. Pagal RdRp filogenetinę analizę buvo nustatyta, kad PMTV yra artimiausias *Beet soil borne virus* (gentis

Pomovirus), *Broad bean necrosis virus* (gentis *Pomovirus*), *Soil borne wheat mosaic virus* (gentis *Furovirus*) ir kitiems furovirusams. RNR-1 koduoja RdRp, kuri savo sudėtyje turi dar ir metiltransferazinį, helikazinį ir polimerazinį domeną. PMTV RNR polimerazė yra homologiška alfa virusams (Sandgren ir kt., 2000).

ORF 1 ir ORF 2 sudaro 89,9 % genomo (Savenkov ir kt., 1999).

RNR-1 5' ir 3' galai susideda iš NCR, kurių ilgis siekia nuo 114 nt iki 489 nt. RNR-1 3' NCR (maždaug 80 paskutinių nt) suformuoja į tRNR panašią struktūrą, kuri iš pradžių buvo aptikta tik RNR-2, vėliau tRNR struktūra buvo identifikuota ir RNR-3 (Savenkov ir kt., 1999). Ši struktūra visose trijose RNR yra vienodo ilgio su identiška seka. PMTV tRNR struktūra turi GAC antikodoną (valino).

RNR-2 dydis yra apie 3 kb (Reavy ir kt., 1998). RNR-2 5' gale yra aptinkama stiebas – kilpa struktūra. RNR-2 gali suformuoti į tRNR panašią struktūrą. Ji turi aminoacilintą akseptorinę ranką, kuri susideda iš 3' galo pseudomazgo su S1 ir S2 stiebais bei plaukų segtuku 2. Taip pat turi segtukus 3 ir 4 su antikodonu valinui plaukų sektuko kilpoje 3. PMTV RNR-2 suformuoja 2 pseudomazgus (C ir D) (Satoshi ir kt., 1994).

Buvo nustatyta, kad praradus viruso RNR-2 nėra pažeidžiamas šio viruso RNR-1 ir RNR-3, judėjimas bei susitelkimas (Savenkov ir kt., 2003).

Viruso RNR-1 ir RNR-2 koduoja viruso replikacijai, inkapsidacijai bei viruso plitimui reikalingus baltymus (Lukhovitskaya ir kt., 2005).

RNR-2 turi tik 1 ORF, kuris koduoja 20 kDa apvalkalo baltymą ir sulietą 67 kDa baltymą. CP baltymas visada prasideda starto kodonu AUG (314-316 nt) (Sandgren ir kt., 2000). Apvalkalo baltymas ORF baigiasi amber kodonu. RNR-2 140 nt gali suformuoti struktūrą 3' gale panašią į tRNR struktūrą (Satoshi ir kt., 1994). Viruso kapsidė susideda iš 1 tipo baltymo subvieneto (Todd, 1967). Antrinė PMTV apvalkalo baltymo struktūra turi 2 paralelines ir 2 anti paralelines alfa spirales (Satoshi ir kt., 1994). RNR-2 koduoja apvalkalo baltymą, pagal kurio serologiją gali būti klasifikuojami virusai.

Sulietas baltymas prasideda kodonu AUG (289 nt) ir baigiasi UAA (2098 nt). Tai sudaro 603 amino rūgščių ir suformuoja 67 kDa dydžio baltymą. Šio baltymo amber terminalinis kodonas gali dalyvauti viruso susirinkime ir jo pernešime grybinio vektoriaus pagalba. Buvo nustatyta, kad delecija sulietame baltyme gali būti susijusi pernešimu vektoriais, po delecijos vektoriai nebegali pernešti viruso (Satoshi ir kt., 1994).

RNR-3 yra 2,4 – 3,1 kb dydžio. RNR-3 pati mažiausia RNR, kuri koduoja TGB ir cisteinu turtingą baltymą (CRP). Trys TGB koduojami baltymai dalyvauja viruso judėjime iš ląstelės į ląstelę (Lukhovitskaya ir kt., 2005).

RNR–3 sudaryta iš 4 ORF. RNR–3 koduoja 4 baltymus. Pirmi trys baltymai (51 kDa, 13 kDa, 21 kDa dydžio) suformuoja TGB, kuris aptinkamas keliose augalų virusų gentyse (Torrance ir kt., 1999). PMTV TGB dalyvauja viruso pernešime iš ląstelės į ląstelę augale – šeimininke. 51 kDa baltymas gali prisijungti prie virusinės RNR, o 13 ir 21 kDa baltymai turi 2 hidrofobinius regionus ir gali prisijungti prie membranos (Savenkov ir kt., 1999).

Ketvirtasis yra mažas, 8 kDa baltymas. Jis turi neįprastai daug cisteino liekanų. Šio baltymo funkcija nėra žinoma. Šio baltymo pirmasis kodonas metioninas yra virtęs valinu (Pečenkova ir kt., 2004). Anksčiau buvo manoma, kad šis baltymas nedalyvauja viruso pernešime ant indikatorinių augalų, tokių kaip *Nicotiana benthamiana*, tačiau neseniai buvo nustatyta, kad CRP baltymas, atvirkščiai, padidina kai kurių ligų pasireiškimą (Lukhovitskaya ir kt., 2005). Šis baltymas padidina viruso virulentiškumą ir nuslopina šeimininko gynybos mechanizmus (Lukhovitskaya ir kt., 2005). Buvo nustatyta, kad kai kuriuose PMTV izoliatuose (Daniškuose izoliatuose) CRP baltymo ORF starto kodonas AUG yra pakeistas GUG kodonu (Pečenkova ir kt., 2004). Kituose pomovirusuose nebuvo aptiktas analogiškas ar panašus baltymas. Analizavus kelis PMTV izoliatų buvo nustatyta, kad CRP yra labai variabilus tarp skirtingų šio viruso izoliatų (Lukhovitskaya ir kt., 2005).

RNR–3 buvo nustatytas ilgas ORF, kuris prasideda nuo 5' nekoduojamos srities ties 288 nt ir tęsiasi iki 3' nekoduojamos srities ties 218 nt. 5' nekoduojama sritis tiek RNR–2, tiek RNR–3 prasideda ta pačia seka GUAUUU. RNR–2 5' gale buvo nustatyta stiebas-kilpa struktūra, kuri susideda iš 50 nt. Tiek RNR–2, tiek ir RNR–3 nekoduojama sritis pasižymi dideliu U kiekiu (RNR-3: 25,7 % A, 16,3 % C, 23,3 % G ir 34,7 % U. RNR-2: 24,2 % A, 19,6 % C, 20,2 % G ir 36,0 % U) (Satoshi ir kt., 1994).

RNR-3 neturi 3' gale poly A trakto (Savenkov ir kt., 1999).

Ilgas koncervatyvus blokas, susidentis iš 150 nt buvo nustatytas PMTV RNR–2 ir RNR–3. Šis blokas prasideda nuo UGA kodono (Satoshi ir kt., 1994).

1.3.3 PMTV augalai-šeimininkai ir vektorius

AUGALAI – ŠEIMININKAI. SIMPTOMAI. PMTV tai vienas iš žalingiausių ir didelę ekonominę žalą sukeliančių bulvių virusas. Šis virusas padaro tiek kokybinę, tiek kiekybinę žalą derliui.

Vektorius *Spongospora subterranea* turi platų šeimininkų ratą, o virusas dažniausiai infekuoja tik *Aizoaceae*, *Chenopodiaceae*, *Solanaceae* šeimų augalus (Cooper ir Asher, 1988; Harrison ir Jones, 1970). Taip pat yra identifikuotos ir kitos šeimos, kurios yra infekuojamos PMTV. Tai *Boraginaceae*, *Coniferae*, *Asteraceae*, *Poacea*, *Urticaea* (Andersen ir kt., 2002).

Natūralus PMTV šeimininkas yra *Solanum tuberosum* (L.) ir keli kiti augalai, priklausantys *Solanaceae* šeimai (Nielsen ir Molgaard, 1996). Šie augalai gali būti infekuojami sistemiškai. Bulviniuose augaluose jis sukelia įvairius simptomus, priklausomai nuo augalų veislės. Skirtingos bulvių veislės skirtingai reaguoja į PMTV: vienos yra jautrios, tuo tarpu kitos yra atsparios šiam virusui (Germundsson ir kt., 2002). PMTV simptomai gali varijuoti, tai taip pat priklauso nuo aplinkos sąlygų (Sokmen ir kt., 1998).

Dažniausiai aptinkami trys augalų pažeidimai: tai geltonos dėmelės arba taškiukai, kurie aptinkami apatiniuose augalo lapuose; V pavidalo pažaidos, kurios randamos ant mažų lapelių; taip pat būdingas ūglių augimo sumažėjimas, kuris dar kitaip vadinama viršūniniu kuokštiškumu (*angl.* mop-top). Ūglių pažeidimai labiausiai pastebimi ir ryškesni, kada yra vėsesnė aplinka (5-15 ° C). Kitas taip pat labai plačiai paplitęs pažeidimas – tai rūdžių spalvos žiedai gumbuose (Molgaard ir Nielsen, 1996). Pirmiausiai simptomai pasireiškia gumbo viduje. Infekuotų virusu gumbų svoris sumažėja iki 26 % jautriuose augaluose. Tačiau kai kuriuose augaluose svorio pakitimai yra nežymūs (Todd, 1967).

PMTV simptomų pasirodymas indikatoriniame augale *C. quinoa* yra uždelstas. Chlorotinės vietinės žaizdos pasireiškia praėjus 10 – 14 dienų po inokuliacijos, kartais jos aptinkamos kartu su nekrotiniais taškais. PMTV inokuliuotame *C. amaranticolor* indikatoriniame augale sukelia diagnostines vietines pažaidas. Tai dažniausiai nekrotiniai taškai ar žiedai. Tokių žiedų dydis vidutiniškai būna nuo 1 iki 5 cm. (Calvert ir Harrison, 1966). Kai kuriuose augaluose tokie pažeidimai plečiasi, kol galų gale viena ar kelios pažaidos padengia visą augalo lapą. PMTV infekcija ant šių augalų nėra sisteminė. (Calvert ir Harrison, 1966).

Vizualiai pagal sukeltus simptomus (rūdžių spalvos žiedus, dėmeles bulvių gumbuose) labai sunku nustatyti, ar tai tikrai yra PMTV, nes panašius simptomus sukelia ir TRV (Sokmen ir kt., 1998). Išdžiovinus dirvožemį greitai eliminuojasi dirvožemyje esantys nematodai, todėl augalai bus infekuojami tik PMTV, o ne TRV (Molgaard ir Nielsen, 1996). Yra nustatyta, kad tos pačios rūšies bulvėse PMTV gali sukelti skirtingus simptomus, kai ta pati bulvė yra auginama skirtingose valstybėse (Nielsen ir Nicolaisen, 2003). Manoma, kad tai yra susiję su skirtingu PMTV genotipu. Taip pat tai gali įtakoti ir kiti veiksniai, tokie kaip klimatas bei dirvožemis. Simptomai varijuoja priklausomai ir nuo sezoniškumo bei oro sąlygų (Molgaard ir Nielsen, 1996).

Pagrindiniai PMTV indikatoriniai augalai yra: *C. amaranticolor*, *N. benthamiana* ir *N. debneyi*. Pirmiausia pasirodo vietinės chlorotinės žaizdos, kurios vėliau pereina į koncentrinis taškuotus žiedus. *N. benthamiana* pirmieji pasirodę simptomai yra sisteminė mozaika, kuri lydima chlorotinių, o vėliau ir nekrotinių pažaidų. *N. debneyi* aptinkami chlorotiniai ir į ažuolo lapo piešinį panašūs pažeidimai, kurie randami kartu su taškiukais.

Augalų, užkrėstų PMTV, stiebai turi trumpus tarpubamblius ir labai tankiai išsidėsčiusius lapus. Kai kuriems iš mažesnių lapų būdingas banguotas margumas (Calvert ir Harrison, 1966).

PMTV izoliatai gali būti grupuojami pagal simptomus, aptinkamus augaluose (Nielsen ir Nicolaisen, 2003):

1. **silpni, neryškūs simptomai:** chlorotinės vietinės žaizdos *C. amaranticolor*, menka sisteminė mozaika *N. benthamiana*, ir chlorotiniai vietiniai žiedai bei dėmės *N. debneyi*.
2. **vidutiniai simptomai:** chlorotinės vietinės žaizdos su koncentriniais taškuotais žiedais *C. amaranticolor*, mozaika su chlorotinėmis pažaidomis *N. benthamiana*, chlorotiniai vietiniai dėmėti žiedai, ažuolo lapo pavidalo pažeidimai, gyslų sumenkėjimas ir taškuotumas *N. debneyi*.
3. **stiprūs simptomai:** tokie pat kaip ir vidutiniai simptomai, tačiau geriau ir aiškiau išreiškiami ir visada pasibaigiantys nekrotinėmis žaizdomis.

Daugelis piktžolių buvo inokuliuotos PMTV, bet tik kai kuriose buvo aptikti simptomai. Pažeisti buvo tokie augalai: *C. album*, *Tussilago farfara* L., *Trifolium pratense*, *T. repens*, *Plantago major*, *Solanum nigrum* (Fuxe, 1979). Buvo nustatyti ir *Spongospora subterranea* šeimininkai: *Beta vulgaris*, *Lycopersicon esculentum* Mill (Fuxe, 1979).

Žiemą *Solanaceous* augalų rūšyse retai kada pasirodydavo simptomai, lėtai vystėsi į sisteminę reakciją (Harrison ir Jones, 1970).

PMTV tabako sultyse praranda infektyvumą, kaitinant 10 minučių 80° C temperatūroje arba laikant 14 dienų 20° C temperatūroje. Infektyvumas stabilizuojamas, kai yra pridedama 0,02 % NaN₃. Simptomų pasireiškimas labai priklauso nuo aplinkos sąlygų. Pirmieji simptomai, kurie pasireiškia inokuliuotuose lapuose, tai nekrotiniai žiedai ir taškai, chlorotiniai taškai. Nekrotinės žaizdos išsiplečia ir suformuoja nekrotines zonas (Harrison ir Jones, 1970).

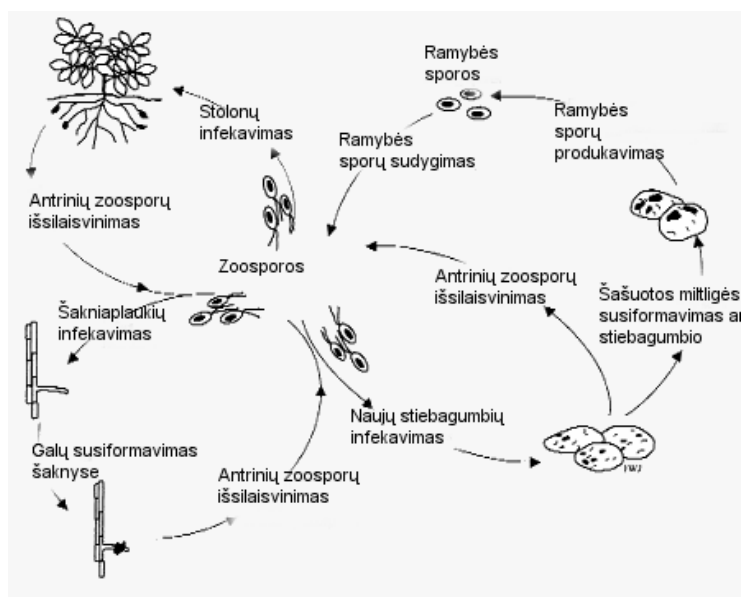
GEOGRAFINIS PAPLITIMAS. Pirmą kartą Šiaurės Airijoje PMTV buvo identifikuotas 1965 metais. 1966 m. PMTV pirmą kartą aptiktas D. Britanijoje. Netrukus po to – ir Šiaurinėje Europoje, Š. Amerikoje ir Azijoje. Kanadoje aptiktas 1991 – 1992, JAV – 2002. Taip pat PMTV yra randamas Centrinėje bei Vakarų Europoje, taip pat Japonijoje, Kinijoje (Hugh ir kt., 1998). Dažniausiai aptinkamas šaltesniuose drėgnesniuose regionuose (Pečenkova ir kt., 2004).

GIMININGUMAS. PMTV savo genomo sandara yra labai panašus į kitus tris pomovirusus: *Beet soil-borne virus* (BSBV), *Beet virus Q* (BVQ) ir *Broad bean necrosis virus* (BSNV). RNR - 3 PMTV yra analogiška kitų pomovirusų RNR-3. PMTV amino rūgščių seka 52 % panaši į BSBV a.r. seką.

VEKTORIUS. *Spongospora subterranea f.sp. subterranea* tai PMTV vektorius, kuris dirvoje išbūna sporų pavidalu (Merz, 1989; Calvert, 1966). Šis grybas – tai miltuoto šašo

(rauplių) ligos sukėlėjas bulvėse. *Spongospora subteranea* priklauso *Plasmodiophoromycetes* klasės grybams. Klasė turi tik vieną gentį *Plasmodiophorales*, kuri turi tik vieną šeimą *Plasmodiophoraceae*, kuriai priklauso *Spongospora* ir kitos 8 gentys. Tai obligatinis parazitai, kuris produkuoja du žiuželius turinčias zoosporas (3-4 μm diametro) (Harrison ir kt., 1997). Šios grupės grybai - tai aukštesniųjų augalų obligatiniai parazitai. Dauguma jų priklauso vektoriams, kurie perneša dirvožemiu plintančius virusus (Arif ir kt., 1995).

Spongospora subteranea plačiai paplitusi pasaulyje. Tai obligatinis parazitai, kuris nepalankių laikotarpį praleidžia ramybės sporų pavidale. 1 ramybės spora produkuoja didelius kiekius *Spongospora subteranea* zoosporangių bulvių šaknyse. Šis patogenas, tai PMTV vektorius, kuris sukelia augalo augimo sumažėjimą bei gumbo nekrozavimą (Xinshun ir Christ, 2006). Šis grybas negali daugintis be augalo šeimnininko gyvų audinių. Tai yra būdinga obligatiniams parazitams. Parazitai gali išgyventi ramybės sporų agregatuose gumbuose, dirvožemyje. Esant palankiom sąlygom, drėgnam dirvožemiui ir žemai temperatūrai (12-18° C) ramybės sporos gali sudygti ir produkuoti pirmines zoosporas, turinčias du žiuželius (Xinshun ir Christ, 2006). Šios infekuoja augalo – šeimnininko šakniaplaukius ir epidermines ląsteles. Vystosi daugiabrandoelis plazmodis, kuris skyla į segmentus ir suformuoja zoosporangę. Sudygusi zoosporangė suformuoja antrines zoosporas, kurios infekuoja šaknis, stolonus ir bulvių gumbus. Kiekviena iš zoosporangių turi nuo 4 iki 8 antrinių zoosporų, kurios gali vėl užkrėsti augalo šaknis (Germundsson ir kt., 2002; Cooper ir Asher, 1988). Šis grybas sukelia miltuoto šašo pažeidimus gumbuose, šaknyse ir stolonuose (Sokmen ir kt., 1998). Detalesnis ir išsamesnis grybo *Spongospora subteranea* gyvenimo ciklas yra pavaizduotas 4 paveiksle.



4 pav. Grybo *Spongospora subteranea* gyvenimo ciklas

Pirminės ir antrinės zoosporos morfologiškai panašios. Antrinės zoosporas galima atskirti pagal žiuželius ir pagal plaukimo būdą. Zoosporos pakeičia savo normalų plaukimą į ameboidinį, kai patenka ant sauso agarų paviršiaus (Kole ir Gielink, 1963).

Infekcija grybu *S. subteranea* yra efektyvi, kai oro temperatūra yra nuo 14 iki 20 °C bei didelis drėgnumas (Germundsson ir kt., 2002). PMTV yra lokalizuotas zoosporų viduje bei gali išlikti infektyvus dirvožemyje apie 18 metų (Andersen ir kt., 2002). Virusas gali plisti kai dirvožemis yra gana drėgnas, o pH gali svyruoti nuo 4,7 iki 7,6. Rūgščioje dirvoje gali būti užkirstas kelias *S. subteranea* sukelti ligą, todėl, kad joje yra aptinkama daug Zn, kuris yra toksiškas šiam grybui. Ši sukeliama liga labiau yra paplitusi šaltesniuose regionuose. Optimali temperatūra ligai išsivystyti yra 12° C. Zoosporos gali būti aktyvios ir žemesnėje temperatūroje (Graaf ir kt., 2005).

Spongospora subteranea yra plačiai paplitusi pasaulyje, išskyrus Antarktidoje ir Afrikoje. Su šiuo grybu yra sunku kovoti, kadangi jis nepalankiomis sąlygomis suformuoja tam tikras sporas, kurios gali išgyventi nepalankų periodą. Virusai ilgai išlieka ramybės sporų viduje, kai yra nepalankios sąlygos. Sąlygoms pagerėjus, virusai vėl gali infekuoti ir būti infektyvūs daugybę metų (Brunt, 1989). Su šiuo grybu yra bandoma kovoti pesticidų ir cinko komponentų pagalba, tačiau norimų rezultatų nebuvo pasiekta. Taip pat naudojami biologiniai agentai, tokie kaip *Trichoderma harzianum*, kuris parazituoja grybo sporas (Nielsen ir Larsen, 2004). Grybo sporos yra atsparios įvairiems chemikalams, bet kartu jos yra jautrios aplinkos pasikeitimams ir pesticidams. Ramybės spora – tai darinys, kuriame aptinkama daug pavienių sporų. Buvo nustatytas logaritminis santykis tarp ramybės sporų tirštumo ir ligos indekso. Zoosporos pradeda sudygti po 3 dienų, o zoosporangė subręsta maždaug po 4-5 dienų po infekcijos. Šioje srityje pastebimas eksponentinis šaknų infekcijos intensyvumo didėjimas. Šį procesą nulemia antrinės zoosporos, kurios susiformuoja maždaug 21 dienos eigoje. Manoma, kad zoosporos praranda savo galimybę dygti, kada jos yra laikomos drėgnoje aplinkoje. Grybo infektyvumas padidėja, kai yra sausinama dirva 20° C 8 dienas arba 40° 2 dienas (Merz, 1989).

Grybo gyvenimo ciklas gali būti skirstomas į 2 fazes (Arif ir kt., 1995):

1. pirminė fazė – plazmodis (zoosporangė), kuri infekuoja šakniaplaukius ir epidermines ląsteles. Išlaisvinamos plaukiojančios zoosporos, kurios gali infekuoti daugiau šaknų;
2. cistogeninė fazė – produkuojamos zoosporos. Pavienės šios sporos dažniausiai susijungia į klasterius ir suformuoja sferinę struktūrą, kuri yra tuščiavidurė. Zoosporos dirvoje gali išgyventi daug metų.

Kovoti su šiais pažeidimais yra sunku, nes zoosporos dominuoja dirvožemyje. Kaip efektyvi kontrolė manoma turėtų būti fungicidai (Xinshun ir Christ, 2006).

STABILUMAS. PMTV sukelti išoriniai augalų simptomai ir jų stiprumas bei raiškingumas priklauso nuo temperatūros svyravimų (Molgaard ir Nielsen, 1996). Aukšta temperatūra stimuliuoja fiziologinius mechanizmus bulvių stiebagumbiuose ir eliminuoja anksčiau susidariusias lankiškos formos pažaidas. Buvo nustatyta, kad fiziologiniai mechanizmai eliminuoja pažeidimus. Tai paaiškina, kodėl, esant aukštai atmosferos temperatūrai, neaptinkami jokie pažeidimai ir simptomai. Dėl šios priežasties daugelių virusų eliminavimui ir inaktyvavimui yra naudojama termoterapija. PMTV virulentiškumas gali būti inaktyvuojamas, kai *S. subterranea* sporos su jose esančiu virusu yra pakaitintos iki 90 °C 15 min (Nielsen ir Molgaard, 1997).

1.4 TRV ir PMTV panašumai bei skirtumai

TRV ir PMTV – tai bulvių virusai, kuriuos diagnozuoti vizualiai yra gana sudėtinga (Mumford ir kt., 2000). Šie virusai pakenkia bulvių kokybei, sukeldami vidinius ar išorinius stiebagumbių pažeidimus, sukelia rudas, nekrotines lankiškas ar linijiškas žaizdas. Šie virusai plačiai paplitę Europoje, Š. Amerikoje.

PMTV yra giminingas TRV. Tarp jų randama daug panašumų. Tiek TRV, tiek PMTV yra dirvožemiu plintantys virusai. Jie kartu gali egzistuoti tame pačiame bulvių lauke. TRV plinta *Trichodorus* ir *Patrichodorus* nematodų pagalba, o PMTV perneša grybas *Spongospora subterranea*.

Abu šie virusai yra sunkiai pernešami iš gumbų ant indikatorinių augalų (Todd, 1967).

Virusų sukelti simptomai gali būti supainiojami su kitais bulvių pažeidimais. Kartais abu virusai gali indukuoti išorinius, nekrotinius žiedus gumbuose, kurie gali būti nematomi.

Nors TRV ir PMTV yra labai panašūs, jie turi ir skirtumų (Calvert ir Harrison, 1966):

- TRV dažniausiai nepažeidžia augalo stiebo;
- PMTV sukelia daugiau išorinių simptomų nei vidinių, tuo tarpu TRV labiau būdingi vidiniai pažeidimai pastebimi, kai stiebagumbis yra perpjaunamas;
- TRV sukelti pažeidimai, tokie kaip nekrotiniai lankai ir linijos yra mažiau smailesni ir aštresni nei PMTV;
- TRV yra pernešamas nematodų iš genties *Trichodorus*. Dažniausiai pernešama šviesiame priemolyje, smėlėtame dirvožemyje arba durpėse. Tuo tarpu PMTV mėgsta vidutinį arba derlingą priemolį ir kitokį dirvožemį, kuriame neaptinkami *Trichodorus*;
- Indikatoriniame augale *Chenopodium amaranticolor* šie virusai sukelia skirtingus simptomus. Tik PMTV jame sukelia koncentrinus žiedus.

II. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

2.1 Medžiagos

2.1.1 Reagentai

β-merkaptoetanolis (ME)	“Serva”
Amonio persulfatas (APS); BIS (N,N’-metilen-bis-akrilamidas); kiaušinio albuminas; Na ₂ CO ₃ ; NaHCO ₃ ; PVP (polivinil pirolidonas); Tris (2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis)	“Roth”
Antikūnai prieš PMTV ir prieš TRV; Konjugatai: Ak prieš TRV su šarminė fosfataze ir Ak prieš PMTV su šarminė fosfataze	DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)
“QuickPrep total RNA extraction kit for the direct isolation of total RNA from most eukaryotic tissues or cells”	“Amersham Bioscience”
Ca(NO ₃) ₂ ·x4H ₂ O; DIECA (natrio dietilditiokarbamatas); EDTA (etilendiamintetraacetatas); KH ₂ PO ₄ ; KCl; KNO ₃ ; Na ₂ HPO ₄ ; MgSO ₄ ·x7H ₂ O; NaH ₂ PO ₄ ; NaN ₃ ; tioglikolio rūgštis; Tween 20; uranilacetatas (UA); MnCl ₂ ·x4H ₂ O; CuSO ₄ ·x5H ₂ O; ZnSO ₄ ·x7H ₂ O; Co(NO ₃) ₂ ·x6H ₂ O; HCl; dietanolaminas (NH(CH ₂ CH ₂ OH) ₂ , Na ₂ HPO ₄ ·x2H ₂ O	“Merck”
DNR fragmentų standartai Φ 174 RFI DNA (<i>Hae</i> III); dNTP mix; M-MuLV AT (Moloney pelių leukemijos viruso atvirkštinė transkriptazė), rekombinantinė <i>Taq</i> polimerazė, RNR’ių inhibitorius, substratas – nitrofenilfosfatas, dažas “6x Loading Dye”	“MBI Fermentas”
Etanolis	AB “Sema”
Etidžio bromidas (EtBr)	“Boehringer Monheim GmbH”
H ₂ SO ₄ ; NaCl	“Lachema”
Fe-EDTA; Na ₂ SO ₃ ; MoO ₃ ; TiO ₂ , Al ₂ (SO ₄) ₃ ·x18H ₂ O;	“Sigma”
Skystas azotas	“ELME-Messer”
TEMED (N,N,N’N’- tetrametiletilendiaminas)	“Roanal”
Pieno rūgštis (C ₃ H ₆ O ₃)	“AppliChem”

2.1.2 Oligonukleotidiniai pradmenys

TRV ir PMTV pradmenys buvo parinkti pasinaudojant literatūros šaltiniais (Weidemann, 1995; Sandgren, 1995; Nicolaisen ir kt., 1999).

Pradmuo	Seka 5’-3’	Tipas	Ilgis, nt	PCR produktas, bp
TRV	CGT GTG TAC TCA AGG GTT G	BTies.	19	364
	GGT GTC CCA AAT TCT CTG	A Atv.	18	

TRV	TAC TCA AGG GTT GTG TGA ATG AAG	BTies.	24	220
	CGT TTA CGA CAC TTT TCA AGG TG	A Atv.	23	
PMTV	CCA CCC TTG GAA ATG GCT GAA	Ties. F1	21	560
	GCC TGA GCG GTT AAT TGC TAT G	Atv. R1	22	

2.1.3 Buferiai ir tirpalai

1. ELIZOS buferiai

Padengimo buferis

1.59 g Na₂CO₃, 2.93 g NaHCO₃, 0.2 g NaN₃, Ištirpinti 900 mL H₂O, privesti pH iki 9.6 su HCl arba NaOH ir pripilti H₂O iki 1 L.

Fosfatinis buferis (PBS)

8.0 g NaCl, 0.2 g KH₂PO₄, 1.15 g Na₂HPO₄, 0.2 g KCl, 0.2 g NaN₃, pH 7.4. Ištirpinti 900 mL H₂O, privesti pH iki 7.4 su HCl arba NaOH ir pripilti H₂O iki 1 L.

Praplovimo buferis (PBST)

PBS + 0.5 mL Tween 20

Ekstracijos buferis

PBST + 2 % PVP

Konjugacijos buferis

PBST + 2 % PVP + 0.2 % kiaušinio albumino

Substrato buferis

97 mL dietanolamino, 600 mL H₂O, 0.2 g NaN₃, Privesti pH iki 9.8 su HCl arba NaOH ir pripilti H₂O iki 1 L.

2. Inokuliacijos buferis

Tobacco rattle virus

0.05 M fosfatinis buferis, 0.3 % DIECA, 0.2 % Na₂SO₃, 12.5 μL tioglikolio rūgšties. pH 7.5.

Potato mop-top virus

40g/L PEG 6000, 4.8 g/L Na₂HPO₄·2H₂O, 0.4 g/L KH₂PO₄, pH 7.7.

3. Elektroforezės buferis

10 xTBE buferis

1L tirpalui reikia: 108 g TRIS, 55 g Boro rūgšties, 40 mL, 0.5 M EDTA. pH 8.

10XTAE buferis

48.4 g/L Tris, 11.4 g acto rūgšties, 0.3 g/L EDTA. pH 8

cDNR mišinys

Mišiniai:

Vienam pavyzdžiui reikia: 4 μL 5× reakcijos buferio, 2 μL 10 mM dNTP, 0.25 μL atvirkštinės transkriptazės (200U/μL), 3.75μL H₂O.

PGR mišinys

Vienam pavyzdžiui reikia: 31.75 μL dejon vandens, 1 μL 200μM pradmens 1 (F), 1 μL 200μM pradmens 2 (R), μL 10 mM dNTP, 5 μL 10xPCR buferio (10 mM Tris, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂), 3 μL 25 mM MgCl₂, 0.25μL Taq polimerazės (5 U/μL). Bendras tūris 43 μL.

Mišinys su RNA'zių inhibitoriumi

150 μL dejon. H₂O + DEPC ir 0.37 μL RNA'zių inhibitorių.

Vieno žingsnio PGR mišinys

Vienam pavyzdžiui reikia: 8 μL DEPC H₂O, 5 μL 5xQiagen buferio, 1 μL 2.5 nM dNTP, 5 μL 5xQ tirpalo, 1,5 μL 10 pmol/μL pradmens A, 1,5 μL 10 pmol/μL pradmens B, 1 μL fermentų mišinio. Bendras tūris 23 μL.

Mineralinių medžiagų tirpalas

Tirpalai:

1 L reikia: 0.505 g KNO₃, 0.710 g Ca(NO₃)₂·4H₂O, 0.272 g KH₂PO₄, 0.492 g MgSO₄·7H₂O, 0.020 g Fe-EDTA, 1 mL Hoaglando A tirpalo.

Hoaglando A tirpalas

1 L reikia: 0.389 g MnCl₂·4H₂O, 0.028 g KBr, 0.028 g LiCl, 0.056 g TiO₂, 0.028 g SnCl₂·2H₂O, 0.028 g MoO₃, 0.056 g CuSO₄·5H₂O, 0.056 g

ZnSO₄·7H₂O, 0.056 g Al₂(SO₄)₃·18H₂O, 0.056 g
NiSO₄·6H₂O, 0.611 g H₃BO₃, 0.056 g Co(NO₃)₂·6H₂O,
0.028 g KI

5 % bis - akrilamido gelis

Geliai:

18 mL dejon. vandens, 2.5 mL 10×TBE buferio, 4.5 mL
bisakrilamido, 15.6 µL TEMED, 100 µL 10% APS
1L reikia: 15 g agarozės ir pripilti TAE buferio iki 1 L.

1.5 % agarozinis gelis

Dažas:

1 L reikia: 63 mL dejonizuoto H₂O, 876 mL (80 %)
Pieno rūgštis, (85 %) 63 mL glicerino (C₃H₈O₃), 25 mL
(2 %) Trifano mėlio (C₂₄H₂₄N₆Na₄O₁₄S₄)

0,05 % Trifano mėlis lakto glicerolyje

2.2 Tyrimo metodai

2.2.1 Augalų – indikatorių metodas

Norint užkrėsti augalą virusu, siūloma pasirinkti tokius indikatorinius augalus, kurie reaguos į tiriamą virusą ir kuriuose išryškės aiškiai pastebimi simptomai ir pažaidos. Dauguma indikatorinių augalų, užkrėstų TRV ir PMTV rodė vietines žaizdas. Tik ne daugelyje augalų buvo nustatyta sisteminė infekcija. Indikatoriniai augalai užkrečiami infekuotų augalų sultimis iš šviežios, šaldytos arba liofilizuotos medžiagos. Užkrečiami jauni augalai 3-5 lapų stadijoje. Užkrėtimas mechaninis.

Užkrėtimo eiga:

1. Indikatorinių augalų lapai yra pabarstomi karborundu (abrazyvine medžiaga).
2. Porcelianiniame grūstuvėlyje sutrinami tiriamieji augalai. Medžiaga trinama inokuliacijos buferiniame tirpale.
3. Paralonišė kempinė sumirkoma paruoštame inokuliacijos tirpale. Ją, prilaikant pincetu, sukamaisiais judesiais švelniai įtrinamas indikatorinio augalo lapo paviršius.
4. Vietinės chlorotinės dėmės arba pageltimas susidaro ant indikatorinių augalų maždaug po 3-7 d., priklausomai nuo temperatūros, o sisteminiai infekcijos simptomai pasirodo praėjus savaitei ar daugiau po inokuliacijos. Surenkami lapai su aiškiais simptomais sveriami, fasuojami, žymimi ir padedami saugoti minusinėje temperatūroje arba liofilizuojami, t.y. užlydomi stiklinėse ampulėse.

2.2.2 Elektroninės mikroskopijos metodas

Tiriamo pavyzdžio paruošimo eiga:

1. Ant specialaus elektroninio mikroskopo tinklelio užnešamas lašas tiriamo pavyzdžio, inkubuojama 5 minutes.
2. Skystis nuo šio tinklelio yra nugarinamas filtriniu popieriumi, ant tinklelio yra užnešamas kontrastavimo dažas - 2 % UA lašas. Laukiama 2 minutes.
3. Vėl nusausinama. Dar kartą užnešamas lašas 2 % UA. Palaikoma 2 min. Ir vėl nugarinama.
4. Tinkleliai nudžiovinami.
5. Pavyzdžiai stebimi elektroniniu mikroskopu JEOL JEM-100S.

2.2.3 Imunofermentinė analizė

2.2.3.1 Tiesioginio dvigubo Ak sumuštinio ELISA metodas (DAS-ELISA)

1. IgG praskiedžiami 1:1000 arba 1:500 su padengimo buferiu. Pridėti 100 µL praskiesto IgG į kiekvieną mikroplokštelės šulinėlį.
2. Inkubuoti 37 °C 2 - 4 h arba +4 °C temperatūroje per naktį.
3. Plauti plokštelę su praplovimo buferiu. Plovimą kartoti 5 kartus. Nusausinti plokštelę apverčiant ją žemyn ant filtrinio popieriaus.
4. Pridėti 100 µL testuojamo pavyzdžio (ekstrahuoto pavyzdžio ekstrakcijos buferyje).
5. Inkubuoti per naktį +4 °C temperatūroje.
6. Praplauti 5 kartus praplovimo buferiu, kaip ir 3 punkte.
7. Į kiekvieną šulinėlį pridėti 100 µL anti-viruso konjugato, atskiesto 1:1000 arba 1:4000 konjugacijos buferyje.
8. Inkubuoti +37 °C temperatūroje 3 valandas.
9. Praplauti 5 kartus kaip 3 punkte.
10. Į kiekvieną šulinėlį pridėti 200 µl šviežiai paruošto substrato (10 mg p-nitrofenilfosfato, ištirpinto 10 mL substrato buferyje). Inkubuoti tamsoje kambario temperatūroje 60-120 minučių.
11. Rezultatų analizavimas. Rezultatai fiksuojami 405 nm bangos ilgyje multiskaneriu (Clark ir kt., 1977).

2.2.4 Totalinės RNR išskyrimas.

RNR gali būti išskiriama iš šaldytos ar šviežios augalinės medžiagos. Išskyrimas gali būti atliekamas dviem būdais:

1. Kai išskyrinėjama iš šviežios augalinės medžiagos nenaudojant skysto azoto.

1. Į specialius polietileninius maišelius (su skiriamuoju tinkleliu viduje) įdedamas tiriamasis augalo pavyzdys. Trinama grūstuvėliu. Užpilama 500 µL 0.1 M fosfatiniu buferiu ir dar patrinama.
2. Iš kitos tinklelio pusės, nei buvo įdėtas augalinis pavyzdys, paimama 400 µL suspensijos su augalo sultimis ir supilstoma į ependorfinius mėgintuvėlius. Mėgintuvėliai visą laiką yra laikomi ant ledo.

2. Kai išskyrinėjama iš šviežios ar šaldytos augalinės medžiagos naudojant skystą azotą.

Pavyzdžiai sutrinami užpylus skysto azoto. Dalis susidariusių sutrintų miltelių perkeliama į ependorfinius mėgintuvėlius ir laikoma ant ledo.

Sekantys virusinės RNR išskyrimo etapai abiem atvejais yra tokie patys. Išskyrimo procedūra atliekama pagal "QuickPrep total RNA extraction kit for the direct isolation of total RNA from most eukaryotic tissues or cells" rekomendacijas, naudojant medžiagas iš šio rinkinio. RNR gali būti išskirta iš audinių nuo 25 mg iki 1g ribose. Audiniai turi būti kiek galima labiau švieži arba liofilizuoti.

Rinkinio komponentai: ekstrakcijos buferis, turintis guanidino tiocianato ir N-lauril sarkozinato; LiCl tirpalas DEPC-paveiktame vandenyje; cezio trifluoracetatas (CsTFA).

Darbo eiga:

1. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 150 µL ekstrakcijos buferio ir po 3 µL ME. Mėginiai sumiksiuojami pipetmanu ir sumaišomi maišyklėje.
2. Pridedama po 350 µL LiCl ir po 500 µL CsTFA, sumaišome maišyklėje.
3. Mėginiai laikomi ant ledo 10 min. Centrifuguojami 14000g 15 min.
4. Nusiurbiamas baltymų ir DNR sluoksnis, nepaliekiant apačioje esančių RNR nuosėdų.
5. Ant RNR nuosėdų užpilama po 75 µL ekstrakcijos buferio, 175 µL LiCl, 250 µL CsTFA. Po kiekvieno įpilto reagento mėginiai maišomi maišyklėje.
6. Centrifuguojama 14000 g 5 min. Atsargiai nupilamas supernatantas, mėgintuvėliai laikomi ant ledo.
7. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilam po 1 mL 70% etanolio (3 ml DEPC H₂O + 7 mL 100% etanolio). Etanolį naudoti tik atšaldytą. Mėgintuvėliai gerai purtomi, kad susidarytų nuosėdos.
8. Mėgintuvėliai inkubuojami -20°C per naktį arba -20°C 2 val. Išėmus iš šaldytuvo, gerai pamiksiuojami ir centrifuguojama 14000 g 5 min.
9. Nupilamas etanolis, nusodiname likusias nuosėdas. Atidaryti mėgintuvėliai laikomi ant ledo 10-15 min. Tokiu būdu yra nugarinamas spiritas.
10. Ant nuosėdų užpilame po 100-150 µL, atsikirai paruošto mišinio (150 µL DEPC H₂O + 0.5 µL RNR 'azių inhibitoriaus).
11. Kratant ant maišyklės, suardomos nuosėdos.
12. Mėgintuvėliai paliekami ant ledo 20 min.
13. Maišoma ant maišyklės, kad ištirptų nuosėdos.
14. Mėgintuvėliai laikomi 10 min 65°C vandens vonioje, taip gaunama išvalyta totalinė RNR, kuri yra saugoma -20°C temperatūroje.

2.2.5 Atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandininė reakcija (AT-PGR)

Dauguma augalų virusų turi nukleorūgštį RNR, todėl yra naudojamas modifikuotas PGR metodas – AT-PGR.

Iš įvairių straipsnių apie TRV buvo išsirinktos pradmenų poros. Kiekvienam virusui yra reikalinga viena pradmenų pora. TRV buvo pasirinktos konservatyvios sekos. Pirmasis pradmuo B yra komplementarus RNR-1 16 kDa baltymą koduojančio geno sekai nuo 6115 nt iki 6133 nt. Antrasis pradmuo A komplementarus to pačio geno sekai nuo 6461 nt iki 6478 nt. PGR specifinis produktas yra apie 364 bp dydžio (Weidemann, 1995).

Taip pat buvo naudojama ir kita TRV pradmenų pora. Pirmasis pradmuo B yra komplementarus TRV SYM kamieno RNR-1 RNR-1 16 kDa baltymą koduojančio geno sekai nuo 6318 nt iki 6340 nt. Antrasis pradmuo A komplementarus to pačio geno sekai nuo 6121 nt iki 6144 nt. PGR specifinis produktas yra 220 bp dydžio (Nicolaisen ir kt., 1999).

PMTV pradmenys, sukurti, remiantis konservatyviomis sekomis. Pradmenys yra komplementarus RNR – 3. F1 pradmuo komplementarus RNR – 3 sekai nuo 302 nt iki 322 nt. R1

pradmuo komplimentarus RNR – 3 sekai nuo 819 nt iki 835 nt. PGR specifinis produktas yra apie 560 bp dydžio (Sandgren, 1995).

AT-PGR eiga:

Išskirtos totalinės RNR denatūracija.

1. Į sterilius plonasienius PGR mėgintuvėlius dedama po: 8 µL pavyzdžio išvalytos totalinės RNR, 1 µL pradmens 2 (reversinio - R) ir 2 µL dejon. H₂O + DEPC. Švelniai pamaišoma.
2. Vykdoma denatūracija termocikleryje, pagal programą: 70 °C 5 min., 4 °C 5 min.

cDNR sintezė.

- Į kiekvieną mėgintuvėlį po denatūracijos supilama po 10 µL cDNR mišinio. Mėgintuvėliai dedami į termociklerį, sintetiname cDNR pagal programą: 37 °C 60 min. ir 70 °C 10 min.

PGR (TRV).

1. Pagaminamas PGR mišinys.
2. Į naujus plonasienius mėgintuvėlius pilame po: 43 µL PGR mišinio ir 7 µL pavyzdžio cDNR. Bendras tūris turi būti 50 µL. Naudojamos kontrolės: K₁ – iš sveiko augalo išskirta RNR ir K₂ – vandens kontrolė.
3. Mėgintuvėliai įdedama į termociklerį. Sintetina kopijos pagal programą:
 - 94 °C – 5 min;
 - 25 ciklai:
 - 94 °C – 45 s;
 - 49 °C – 46 s;
 - 72 °C – 60 s;
 - 72 °C – 5 min.
 - 4 °C - ∞.

Programai pasibaigus termocikleris mėgintuvėlius laiko +4 °C temperatūroje. DNR produktų analizė atliekama vertikaliame 5% poliakrilamido elektroforezės gelyje.

Vieno žingsnio AT-PGR

1. Paruošiamas vieno žingsnio PGR mišinys.
2. Į kiekvieną mėgintuvėlį pilama 23 µL paruošto mišinio ir 2 µL išvalytos totalinės RNR.
3. Mėgintuvėlius sudedame į termociklerį ir paleidžiame programą:
 - PMTV skirta programa:
 - 50 °C – 30 min
 - 95 °C – 15 min
 - 35 ciklai:
 - 94 °C – 30 s
 - 56 °C – 30 s
 - 72 °C – 60 s

- 72 °C – 10 min
 - 4 °C - ∞
 - TRV skirta programa:
 - 50 °C – 30 min
 - 95 °C – 15 min
 - 35 ciklai:
 - 94 °C – 30 s
 - 64 °C – 30 s
 - 72 °C – 30 s
 - 72 °C – 5 min
 - 4 °C - ∞
4. Rezultatų analizė atliekama elektroforezės gelyje.

2.2.6 Serologiškai sugauto viruso atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandininė reakcija (*angl.* Immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction, IC-AT-PGR)

1. PGR ependorfinius mėgintuvėlius padengiame viruso antikūnais. Į kiekvieną mėgintuvėlį pilame po 100 µL praskiestų antikūnų (skiedžiame santykiu 1:1000, padengimo buferiu).
2. Inkubuojame +37 °C temperatūroje 3 valandas.
3. Mėgintuvėlius praplauname kelis kartus praplovimo buferiu.
4. Mėgintuvėliai padengiami tiriamaisiais augaliniais pavyzdžiais. Į kiekvieną iš jų pilame po 100 µL pavyzdžio (pavyzdžiai skiedžiami santykiu 1:3 su ekstrakcijos buferiu).
5. Inkubuojame per naktį +4 °C temperatūroje.
6. Toliau vykdomi tokie patys etapai kaip ir AT-PGR. T.y. denatūracija, cDNR sintezė, PGR.
7. Rezultatų analizė atliekama vertikaliame 5% poliakrilamido elektroforezės gelyje.

2.2.7 DNR elektroforezė

2.2.7.1 Poliakrilamidinis gelis

1. Paruošiamas 5 % bis - akrilamido gelis.
2. Sumaišoma 2 µL dažo su 10 µL PGR produktu. Į gelio šulinėlius pilame po 11 µL pavyzdžio su dažu. Kraštiniuose šulinėliuose pilama po 2.5 µL DNR markerio Φ174 RFI DNA (*Hae* III). Šio DNR fragmentų standarto bazių poros nuo viršaus link apačios yra: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72.
3. Elektroforezės aparatas įjungiamas į tinklą. Palaikoma 150 W srovė. Elektroforezė tęsiama, kol dažas nukeliauja 2/3 gelio ilgio.
4. Gelis išimamas ir 20 min. dažomas etidžio bromido dažu.
5. Gelis praplaunamas vandeniui 15 min.
6. Produktas analizuojamas UV bangų šviesoje, gali būti fiksuojamas fotografuojant.

2.2.7.2 Agarozės gelis

1. Paruošiamas 1.5 % agarozės gelis.

2. Sumaišoma 2 μ L dažo su 5 μ L PGR produktu. Į gelio šulinėlius pilame po 5 μ L pavyzdžio su dažu. Kraštiniuose šulinėliuose pilama po 5 μ L DNR markerio λ DNR/EcoR1 + Hind III. Šio DNR fragmentų standarto bazių poros nuo viršaus link apačios yra: 21226 bp, 5148 bp, 4973 bp, 4268 bp, 3530 bp, 2027 bp, 1904 bp, 1584 bp, 1375 bp, 947 bp, 831 bp, 564 bp.
3. Elektroforezės aparatas įjungiamas į tinklą. Palaikoma 90 W srovė. Elektroforezė tęsiama, kol dažas nukeliauja 2/3 gelio ilgio.
4. Gelis išimamas ir 15 min. dažomas etidžio bromido dažu.
5. Gelis praplaunamas vandeniu porą minučių.
6. Produktas analizuojamas UV bangų šviesoje, gali būti fiksuojamas fotografuojant.

2.2.8 TRV gryninimas ir koncentravimas (Taylor, 1998)

1. Paruošiami 30 mM ir 50 mM fosfatiniai buferiai (pH 7.5).
2. Susmulkinta užšaldyta augalinė medžiaga sudedama į homogenizatoriaus cilindrą ir užpilama dvigubai didesniu tūriu 50 mM fosfatinio buferio (pH 7.5), kurio sudėtyje yra 0.15 % tioglikolio rūgšties.
3. Homogenizatorius patalpinamas į indą su ledu, homogenizuojama porą minučių.
4. Homogenizatas laikomas -20 °C temperatūroje 1 savaitę.
5. Homogenizata atitirpiname kambario temperatūroje ir laikome 1 parą.
6. Homogeniška masė perkošiama per tankią marlę, surenkamas skystis, o medžiaga nepraėjusi pro marlę išmetama.
7. Surinktas skystis centrifuguojamas K-24 10 000 aps/min 4 °C temperatūroje 5 minutes.
8. Nuosėdos atskiriamos nuo supernatanto.
9. Baltymų išsodinimas. Ant nuosėdų užpilama 10 % PEG 6000 (polietilenglikolio) ir 2 % NaCl. Procedūra atliekama kambario temperatūroje.
10. Mišinys lėtai maišomas magnetine maišykle +4 °C temperatūroje 3 valandas.
11. Centrifuguojama K-24 15 000 aps/min +4 °C temperatūroje 5 minutes.
12. Supernatantas nupilamas, o nuosėdos resuspenduojamos 30 mM fosfatiname buferyje (pH 7.5). Iš gauto tirpalo paimami pavyzdžiai EM.
13. Virusas gryninamas, centrifuguojant K-24 10 000 aps/min +4 °C temperatūroje 5 minutes.
14. Toliau bandoma pašalinti likusias augalines dalis ir surinkti viruso suspensiją. Į augalų ekstraktą pridedama ¼ tūrio dalis chloroformo:butanolio (santykiu 1:1).
15. Centrifuguojama K-24 2500 aps/min +4 °C temperatūroje 5 minutes.
16. Surenkamas apatinis sluoksnis, kuriame yra virusas.
17. Šis apatinis sluoksnis reekstrahuojamas distiliuotu vandeniu.
18. Nupilamas vandeninis sluoksnis. Kiekvieno mėgintuvėlio apačioje įleidžiamas 3mL 30 % sacharozės tirpalas ir užpilama 50 mM fosfatinio buferio (pH 7.5), kurio sudėtyje yra 0.15 % tioglikolio rūgšties.
19. Centrifuguojama VAC 601 23000 aps/min (74000 g) 4 valandas. Paimamas pavyzdys EM.
20. Virusų kiekis įvertinamas spektrofotometriškai. Matuojamas viruso absorbcijos spektras 260 ir 280 nm bangos ilgiuose. Fiksuojami parodymai.
21. Norint geriau išgryninti virusą, naudojamas sacharozės gradientas. Padaromi dviejų koncentracijų: 50 % ir 10 % sacharozės tirpalai. Paruošiamas sacharozės gradientas centrifuginiame mėgintuvėlyje. Ant viršaus yra užnešamas pavyzdys.
22. Centrifuguojama VAC 601 74000 g.
23. Virusų pavyzdys nusistovi tam tikroje vietoje.

24. Šią frakciją surenkame ir į išvalyto viruso preparatą įdedamas NaN_3 , saugomas $+4\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje.

2.2.9 Grybo *Spongospora subterranea* infektyvumas ir produktyvumas

1. *Lycopersicon esculentum* Mill. (pomidorai) infekuojami grybu *Spongospora subterranea*. Ir auginami vandeninėje sistemoje 1 savaitę. Auginame kambaryje, kur yra šviesos ir tamsos ciklas (16 valandų šviesa ir 8 valandas tamsos). Taip pat palaikoma pastovi $16\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūra.
2. Infekuoti augalai panardinami į vandeninę sistemą su kitais 3 sveikais pomidorais.
3. Po savaitės sveiki augalai tampa infekuoti grybo zoosporomis.
4. Kiekvienas infekuotas augalas patalpinamas į stiklinę su vandeniu ir mineralinėmis medžiagomis (santykis 1:5) bei 25 % antibiotiko novobiocino.
5. Stiklinė apvyniojama folija ir laikoma kambaryje 1 dieną, kur yra šviesos ir tamsos fazės, palaikoma pastovi $16\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūra.
6. Po dienos augalai išimami, vanduo išpilamas į mėgintuvėlį.
7. Centrifuguojame centrifuga Megafuge 1.0 R 6000 aps/min 20 min. $20\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje.
8. Zoosporos nusėda į dugną. Jas suspenduojame 1 mL vandens.
9. Zoosporos žiūrimos mikroskopu Nikon 133147, (x40), skaičiuojamos su Gorajjevo kamera. Jų koncentracija apskaičiuojama pagal formulę:

$$\text{Koncentracija} = \text{Suma} \times 1000/16$$

10. Tie patys augalai perkeliama į šviežų vandenį su mineralinėmis medžiagomis bei antibiotiku.
11. Laikoma vėl 1 dieną.
12. Po dienos skaičiuojamas zoosporų kiekis.

Kiekvieną savaitę yra nustatomas šio grybo infektyvumas pagal augalo šaknyje aptinkamas zoosporanges, naudojant Kolo skalę (Kole, 1954).

Kolo skalė:

- 0 – nėra zoosporangių – nėra infekcijos;
- 1 – kelios zoosporangės – labai silpna infekcija;
- 2 – kelios šaknys su zoosporangėmis – silpna infekcija;
- 3 – daug zoosporangių visose šaknyse – vidutinė infekcija.
- 4 – labai daug zoosporangių, aptinkama visose šaknyse – sunki infekcija.

2.2.9.1 Zoosporangių stebėjimas mikroskopu

1. Paimama jaunų bulvių šaknų. Jos nuplaunamos vandeniu.
2. Šaknys užpilamos dažu (1% trifano mėlynojo laktoglicerolyje). Dažas užpilamos taip, kad šaknys būtų apsemtos.
3. Šaknys laikomos vandens vonioje $60\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūra apie 10 min tol, kol nusidažys.
4. Šaknis praplauname kelis kartus vandeniu ir žiūrime pro mikroskopą Nikon 133147, (x20) ar yra zoosporangės.

2.2.9 PMTV plitimo greitis indikatoriniuose augaluose

1. *Potato mop-top virus* inokuliuojami augalai indikatoriai. Pasirenkami tokie augalai šeimininkai, kurie sukelia sisteminės reakcijas arba vietines žaizdas šiuose augaluose.
2. Pasirenkami ir sveiki, virusu neužkrėsti augalai, kurie tolimesniuose eksperimentuose bus naudojami kaip neigiama kontrolė. Šie augalai infekuojami tos rūšies sveiko augalo sultimis.
3. Augalai auginami šiltnamyje.
4. Kas trečią dieną augalai tikrinami, ar yra infekuoti PMTV. Nuo kiekvieno augalo imami pavyzdžiai nuo šio augalo šaknų, vidurinių lapų, inokuliuotų lapų, bei viršutinių lapų. Taip pat daroma ir su augalais, kurie naudojami kaip neigiama kontrolė. PMTV identifikuojamas, remiantis ELISA metodu.

III. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Augalų – indikatorių metodas

Indikatoriniai augalai buvo užkrečiami mechaniškai, pasirenkant jauną augalą 3-5 lapų stadijoje. Inokuliacija buvo atliekama infekuotų augalų sultimis iš šviežios ir liofilizuotos medžiagos inokuliacijos buferyje (pH 7.5). TRV atveju, ne visi inokuliacijai naudoti indikatoriniai augalai reagavo vietinėmis žaizdomis. Kai kuriuose augaluose (pavyzdžiui *Nicotiana benthamiana*,) visai nebuvo aptikti jokie simptomai, nors TRV buvo identifikuotas imunofermentinės analizės metodu. Kituose jautriuose šiam virusui indikatoriniuose augaluose maždaug po 4 ar daugiau dienų išryškėdavo vietinės žaizdos, kurios yra pavaizduotos 4 paveiksle. Vietinės žaizdos buvo aptiktos *Chenopodium quinoa*, *Atriplex hortensis*, *N. tabacum*, tačiau daugiausiai simptomų buvo nustatyta augale – indikatoriuje *N. debneyi*, kurioje pasireiškė vietinės žaizdos.



4 pav. TRV sukeltos vietinės žaizdos *Atriplex hortensis* (kairėje) ir *Nicotiana tabacum* cv. Samsun (dešinėje) lapuose.

Augalų – indikatorių metodu buvo tiriamas TRV augalų šeimininkų ratas. Šiuo virusu buvo užkrėsti tiriamieji augalai, jautrūs šiam virusui bei augalai, pripažinti TRV diagnostinėmis rūšimis. Gauti rezultatai pateikti 4 lentelėje.

4 lentelė. TRV izoliato šeimininkų rato tyrimų rezultatai.

Augalo rūšis	<i>Iz.0517 N.debneyi</i>		<i>N.debneyi SMO</i>	
	Simptomai	Pakartotina inokuliacija	Simptomai	Pakartotina inokuliacija
<i>Cucumis sativus</i> ,	-		-	
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-	+	-	
<i>Nicotiana debneyi</i>	LL (žiediški)	+	Mo, Ma	+
<i>N. benthamiana</i>	-			
<i>N. rustica</i>	LL (žiediški)			
<i>N. tabacum</i> , cv. 'Xanthi'	LL (žiediški)			

<i>Phaseolus vulgaris</i> ,	-	-		
<i>Vigna sinensis</i>	-			
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-			
<i>Tetragonia expansa</i>	-	+	LL	+
<i>Atriplex hortensis</i>	LL	+		
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL+S	+	LL (chlorotinės ir nekrotinės)	+
<i>N. tabacum</i> cv. Samsun			-	
<i>Celosia cristata</i>			LL	+
<i>Nicandra physalodes</i>	-			

LL – vietinės žaizdos (local lesions), S – sisteminė infekcija, Mo – margumas, Ma – deformacija.

TRV tiriamuosiuose augaluose sukėlė vietines žaizdas, kai kada šios pažaidos pasireiškė chlorotinėmis ir nekrotinėmis žaizdomis. Tik *N. debneyi* augale jis sukėlė sisteminę reakciją. Palyginus gautus duomenis su literatūra, buvo nustatyta, kad tokie simptomai ir pažeidžiamų augalų spektras yra charakteringi TRV (Mumford ir kt., 2000; Harrison ir Robinson, 1978).

Potato mop-top virus infekuoja nedidelį augalų šeimininkų spektrą, daugelyje tiriamųjų augalų šis virusas sukelia vietines žaizdas. PMTV labai sunkiai persiduoda mechaniškai inokuliuojant augalus. Kai kuriuose indikatoriniuose augaluose nebuvo aptikti jokie simptomai. Šiuo metodu buvo nustatyti jautriausi šiam virusui augalai šeimininkai. Tai *N. debneyi*, *N. tabacum*, *N. benthamiana*, *N. clevelandii*. *Ch. amaranticolor* PMTV sukėlė vietines nekrotines žaizdas, tačiau šių pažaidų nebuvo labai daug. *N. debneyi* ir *N. tabacum* dažniausiai sukėlė vietines chlorotines bei nekrotines žaizdas. *N. clevelandii* šis virusas taip pat sukėlė vietines žaizdas, tik *N. benthamiana* buvo aptinkama sisteminė reakcija (5 pav.). Visame augale pastebima lapų mozaika. Simptomai dažniausiai pasireiškia praėjus 2 – 3 savaitėms po inokuliacijos, kartais simptomai išryškėja ir anksčiau (Harrison ir Jones, 1970). Šiuo atveju pirmuosius simptomus buvo galima pastebėti praėjus 9 dienom nuo inokuliacijos.



5 pav. PMTV sukelta sisteminė reakcija indikatoriniame augale *Nicotiana benthamiana*

3.2 Elektroninė mikroskopija

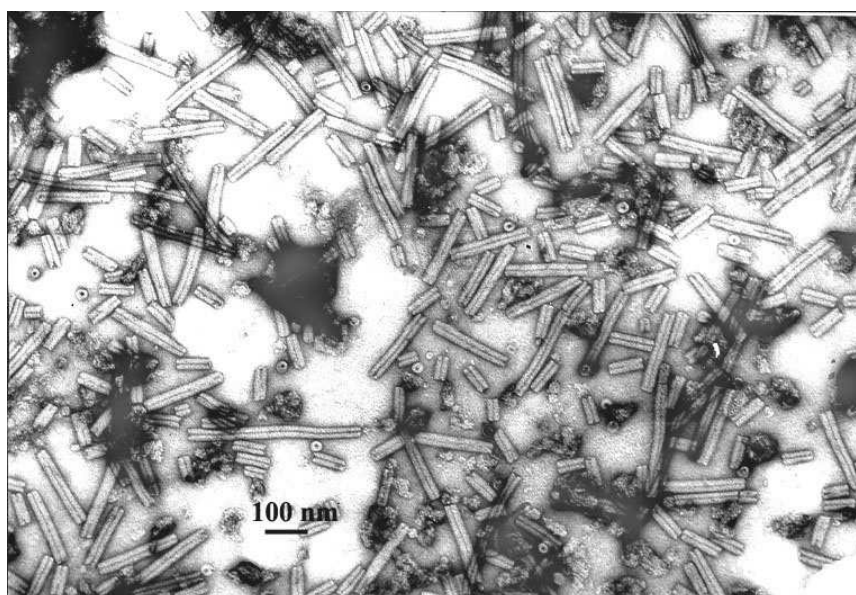
Elektroninės mikroskopijos metodas buvo naudojamas virusinių dalelių, išskirtų iš infekuotų augalų, morfologinių savybių analizavimui bei išgryninto viruso preparatų tyrimui. Tiriamieji pavyzdžiai buvo dažomi negatyviniu dažu (2% UA) ir analizuojami JEOL JEM-100S (peršviečiamuoju) transmisiniu EM.

EM pagalba tiriamuosiuose augaluose su vietinėmis žaizdomis ar sisteminė reakcija buvo aptiktos lazdelės formos TRV dalelės. Viriono centre yra matomas kanalas, kurio diametras maždaug 4 – 5 nm. Gauti rezultatai atitinka literatūroje pateikiamus duomenis (Faugnet ir kt., 2005). 6 paveiksle yra pateikiama TRV iš infekuoto augalo elektroninės mikroskopijos nuotrauka.

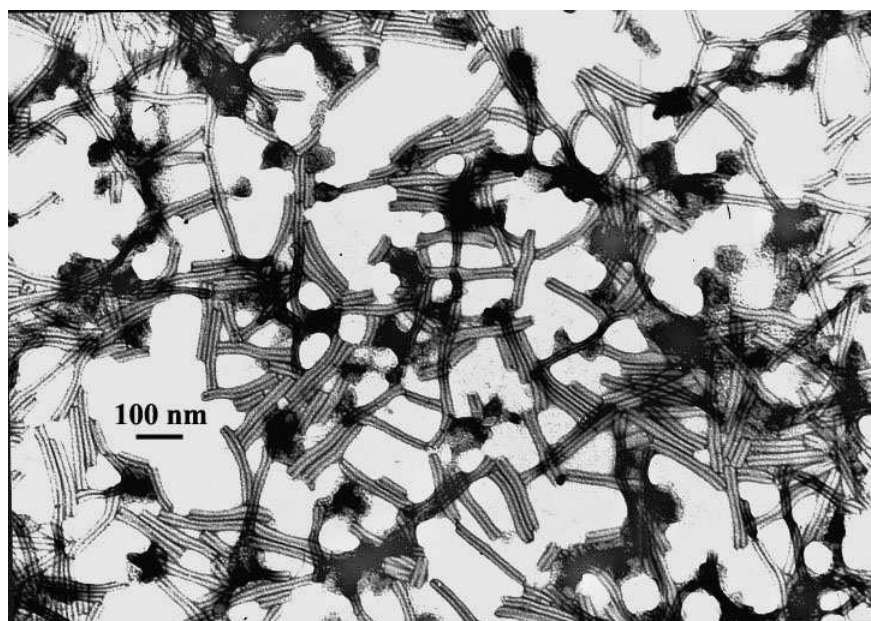


6 pav. TRV virusinės dalelės elektroninės mikroskopijos nuotrauka. Šio viruso dalelės infekuotame *N. debneyi* augale

7 ir 8 paveiksluose yra pateiktos išgryninto TRV preparato nuotraukos, kuriose aiškiai matoma, kad TRV, tai lazdelės formos virusas su ryškiai pastebimu kanalu viduryje.



7 pav. Grynintas TRV preparatas



8 pav. TRV preparatas po sacharozės gradiento

3.3 TRV gryninimas

Viruso gryninimui buvo imta užšaldyta (25 g) augalinė virusuota medžiaga (TRV izoliatas 0517 iš flokso (*Phlox paniculata* L.). *N. debneyi* (Smo – sisteminė mozaika) buvo naudojamas viruso padauginimui.

Po paskutinio ultracentrifugavimo yra matuojama virusinio preparato UV absorbcija (optinis tankis, ekstinkcija) spektrofotometru. Matuojama absorbcija 260 nm ir 280 nm bangos ilgiuose. Išmatavus virusinio preparato A_{260} , galima spręsti apie išvalytame preparate, esančią viruso koncentraciją vadovaujantis tuo, kad TRV ekstinkcijos koeficientas yra 3 (esant viruso koncentracijai 1 mg/mL $A_{260} = 3$).

Išanalizavus gautus duomenis ir apskaičiavus baltymo koncentraciją pagal formulę $((1.55 \times A_{280}) - (0.76 \times A_{260}))$, buvo nustatyta, kad gautame preparate viruso koncentracija yra 1.07 mg/mL, o baltymo koncentracija - 2.16 mg/mL. Išgryninto viruso rezultatai apibendrinti 5 lentelėje.

5 lentelė. Išgryninto TRV rezultatai.

Augalinė medžiaga	Lapų svoris, g	A_{260} , OD*	A_{280} , OD*	Viruso konc, (mg/mL)	Viruso kiekis, mg	Viruso baltymo konc, (mg/mL)	Išėiga, %
TRV Iz. 0517 iš augalo Flokso; indikatorinis augalas – <i>N. debneyi</i> SMO	25	0.321	0.297	1.07	0.642	2.16	25.07

*Mėginiai atskiesti 10 kartų

3.4 Imunofermentinė analizė (Tiesioginis DAS-ELISA)

Imunofermentinis metodas – tai labai jautrus metodas, padedantis aptikti ir identifikuoti viruso buvimą augale. DAS-ELISA metodas buvo naudojamas dirvožemiu plintančių virusų – TRV ir PMTV identifikacijai.

TRV identifikavimas. Vienas labiausiai paplitusių dirvožemiu plintančių virusų yra TRV. Identifikacijai pavyzdžiai buvo paimti iš indikatorinių augalų, inokuliuotų šiuo virusu, iš įvairių dekoratyvinių augalų.

Tyrimui buvo naudojami teigiama ir neigiama kontrolės bei šie indikatoriniai augalai:

- 1 pavyzdys – *Celosia* LL (Izoliatas 0521, Ežėinis, 2005 08 19);
- 2 pavyzdys – *Nicotiana debneyi* S (Iz. 0539, Kardelis, 2005 09 22);
- 3 pavyzdys – *Gomphrena globosa* L (Iz. 9031 Krokas, 2005 08 19);
- 4 pavyzdys – *Celosia* LL (Iz. 0522 Ežėinis, 2005 08 19);
- 5 pavyzdys – *Chenopodium amaranticolor* L (Iz. 0538 Cimbidium hybrida, 2005 09 22);
- 6 pavyzdys (K⁺)– paimama iš DAS-ELISOS rinkinio;
- 7 pavyzdys (K⁻)– sveiko augalo sultys.

Teigiamos ir neigiamos kontrolės padeda tinkamai įvertinti gautus rezultatus, nustatyti ir identifikuoti tiriamus virusus.

Pirmiausiai 96 šulinėlių plokštelė yra užnešama antikūnais, vėliau pavyzdžiais, konjugatu ir substratu. Po kiekvienos medžiagos užnešimo reikalinga inkubacija. Viskas daroma pagal protokolą, kuris išsamiai apibūdintas metoduose (Clark ir kt., 1977).

Rezultatai matuojami fotometru (Multiskan RC Labsystems) 405 nm bangos ilgyje. Šios reakcijos pagrindas – spalvinė reakcija. Šių reakcijų dėka yra gaunami optiniai tankiai, pagal kuriuos nustatoma, ar tiriamas virusas yra tiriamuosiuose pavyzdžiuose. Lyginame tiriamo pavyzdžio optinį tankį su teigiamos ir neigiamos kontrolės optiniu tankiu. ELISA analizėje teigiamai įvertinami tie pavyzdžiai, kurių optinis tankis didesnis arba lygus 3 kartus negu neigiama kontrolė (Clark ir kt. 1977).

Gauti duomenys pateikti 6 lentelėje, o grafiškai pavaizduota 9 paveiksle.

6 lentelė. TRV pavyzdžių matavimo rezultatai

Pavyzdžiai	1 pav.	2 pav.	3 pav.	4 pav.	5 pav.	6 pav.(K+)	7 pav.(K-)
Rezultatai	0.919	3.396	0.186	0.148	0.133	3.521	0.234
	+	+	-	-	-		



9 pav. Grafinis ELISA rezultatų pavaizdavimas

Iš šioje lentelėje pateiktų duomenų, galima nustatyti, kad TRV buvo aptiktas tik 1 ir 2 pavyzdžiuose. Pirmas pavyzdys (*Celosia* LL (Izoliatas 0521, Ežėinis, 2005 08 19)) rodė vietines žaizdas, o kitas pavyzdys (*Nicotiana debneyi* S (Iz. 0539, Kardelis, 2005 09 22)) - sisteminę reakciją. DAS-ELISA metodu TRV buvo taip pat identifikuotas bulvėse. Kai kuriuose bulvėse buvo aptikti pažeidimai – nekrotiniai lankai ir žiedai bulvių gumbuose – kurie charakteringi tiriamajam virusui. Tyrimui buvo naudojami šie pavyzdžiai:

- 1 pavyzdys – bulvė veislė („Aladin“)
- 2 pavyzdys – bulvė veislė („Aladin“)
- 3 pavyzdys – bulvė veislė („Salist“)
- 4 pavyzdys – bulvė veislė („Salist“)
- 5 pavyzdys (K⁺)– paimama iš DAS-ELISOS rinkinio
- 6 pavyzdys (K⁻)– naudojamos sveiko augalo sultys.

Atlikus DAS ELISA, gauti rezultatai pateikiami 7 lentelėje ir grafiškai pavaizduota 10 paveiksle.

7 lentelė. TRV bulvių pavyzdžių matavimo rezultatai

Pavyzdžiai	1 pav.	2 pav.	3 pav.	4 pav.	5 pav.(K⁺)	6 pav.(K⁻)
Rezultatai	0.448	0.228	0.093	0.082	0.958	0.087
	+	+	-	-		



10 pav. Grafinis ELISA rezultatų pavaizdavimas

Gauti rezultatai parodė TRV identifikaciją tik „Aladin“ veislės bulvėse, kurie pavaizduoti 1 ir 2 numeriais.

PMTV identifikavimas. PMTV identifikacijai buvo pasirinkta 30 bulvių gumbų (bulvių veislė – “Saturna”), kuriuose matėsi šiam virusui būdingi simptomai (rudi žiedai ar lankai stiebagumbyje). DAS-ELISA metodo dėka PMTV buvo identifikuotas ne visuose pavyzdžiuose. Teigiami rezultatai buvo nustatyti tik 4, 5, 10, 12, 13, 19, 20, 23, 27, 28 pavyzdžiuose. Gauti rezultatai yra pateikti 8 - 11 lentelėse ir grafiškai pavaizduota 11 paveiksle.

8 lentelė. PMTV rezultatai, naudojant ELISA metodą

Pavyzdžiai	1 pav.	2 pav.	3 pav.	4 pav.	5 pav.	6 pav.	7 pav.	8 pav.
Rezultatai	0.075	0.073	0.081	0.286	0.419	0.058	0.113	0.116
	-	-	-	+	+	-	-	-

9 lentelė. PMTV rezultatai, naudojant ELISA metodą

Pavyzdžiai	9 pav.	10 pav.	11 pav.	12 pav.	13 pav.	14 pav.	15 pav.	16 pav.
Rezultatai	0.078	0.597	0.090	2.034	1.421	0.064	0.077	0.082
	-	+	-	+	+	-	-	-

10 lentelė. PMTV rezultatai, naudojant ELISA metodą

Pavyzdžiai	17 pav.	18 pav.	19 pav.	20 pav.	21 pav.	22 pav.	23 pav.	24 pav.
Rezultatai	0.074	0.069	0.536	3.400	0.078	0.068	3.251	0.148
	-	-	+	+	-	-	+	-

11 lentelė. PMTV rezultatai, naudojant ELISA metodą

Pavyzdžiai	25 pav.	26 pav.	27 pav.	28 pav.	29 pav.	30 pav.	31 pav(K+)	32 pav(K-)
Rezultatai	0.069	0.102	1.688	2.499	0.110	0.077	0.829	0.070
	-	-	+	+	-	-		

“+” pažymėtuose pavyzdžiuose buvo identifikuotas virusas.



11 pav. Grafinis ELISA rezultatų pavaizdavimas

PMTV taip pat buvo identifikuotas ir indikatoriniuose augaluose. Tyrimui buvo pasirinkta kuo daugiau skirtingų PMTV izoliatų ir inokuliuotas indikatorinis augalas *N. benthamiana*, nes tik šiame augale virusas sukelia ryškias sistemines reakcijas bei tokiu būdu taip pat padauginama virusinė medžiaga. 12 lentelėje yra plačiau apibūdinta, kokie PMTV izoliatai buvo naudojami šiame eksperimente.

12 lentelė. PMTV identifikavimui naudojami pavyzdžiai ELISA metodu

1. <i>N. benthamiana</i> inokuliuota Iz. 54-7	9. <i>N. benthamiana</i> inokuliuota Iz. 54-21
2. <i>N. benthamiana</i> inokuliuota Iz. 54-3	10. <i>N. benthamiana</i> inokuliuota Iz. 54-22
3. <i>N. benthamiana</i> inokuliuota Iz. 54-4	11. <i>N. benthamiana</i> inokuliuota Iz. 54-23
4. <i>N. benthamiana</i> inokuliuota Iz. 54-12	12. <i>N. benthamiana</i> inokuliuota Iz. 54-24
5. <i>N. benthamiana</i> inokuliuota Iz. 54-15	13. <i>N. benthamiana</i> inokuliuota Iz. 54-25
6. <i>N. benthamiana</i> inokuliuota Iz. 54-16	14. <i>N. benthamiana</i> inokuliuota Iz. 54-26
7. <i>N. benthamiana</i> inokuliuota Iz. 54-17	15. <i>N. benthamiana</i> inokuliuota Iz. 54-27
8. <i>N. benthamiana</i> inokuliuota Iz. 54-20	16. <i>N. benthamiana</i> inokuliuota Iz. 54-36

N. benthamiana inokuliacija PMTV naudojama ne tik todėl, kad šiame augale jis sukelia ryškias sistemines reakcijas, bet taip pat norint atskirti du labai panašius virusus tokius, kaip TRV ir PMTV. Šie abu virusai *N. benthamiana* sukelia skirtingas pažaidas (TRV – vietinės žaizdas, o PMTV – sisteminę reakciją). Tai vienas iš būdų vizualiai nustatyti, koks virusas (TRV ar PMTV) infekavo tiriamą pavyzdį (Todd, 1967).

ELISA analizėje visi naudoti PMTV izoliatai buvo padauginti indikatoriniame augale. Taip pat buvo naudojama neigiama kontrolė – sveikas augalas bei teigiama kontrolė – PMTV

infekuotas augalas. DAS-ELISA teigiamai įvertinami tie pavyzdžiai, kurių optinis tankis 3 kartus didesnis negu neigiama kontrolė (Clark ir kt. 1977). Gauti rezultatai pateikiami 13-15 lentelėse.

13 lentelė. PMTV rezultatai, naudojant ELISA metodą

Pavyzdžiai	1 pav. (Iz.54-7)	2 pav. (Iz.54-3)	3 pav. (Iz.54-4)	4 pav. (Iz.54-12)	5 pav. (Iz.54-15)	6 pav. (Iz.54-16)
Rezultatai	0.066 -	0.070 -	0.076 -	0.403 +	2.021 +	1.326 +

14 lentelė. PMTV rezultatai, naudojant ELISA metodą

Pavyzdžiai	7 pav. (Iz.54-17)	8 pav. (Iz. 54-20)	9 pav. (Iz.54-21)	10 pav. (Iz.54-22)	11 pav. (Iz.54-23)	12 pav. (Iz.54-24)
Rezultatai	1.053 +	0.302 +	1.458 +	2.173 +	1.248 +	0.560 +

15 lentelė. PMTV rezultatai, naudojant ELISA metodą

Pavyzdžiai	13 pav. (Iz.54-25)	14 pav. (Iz.54-26)	15 pav. (Iz.54-27)	16 pav. (Iz.54-36)	17 pav. (K+)	18 pav. (K-)
Rezultatai	1.741 +	2.450 +	2.631 +	0.069 -	2.608	0.073



12 pav. Grafinis ELISA rezultatų pavaizdavimas

Tik 4 iš visų šiame eksperimente naudotų PMTV izoliatų, nedavė teigiamų rezultatų. Visuose kituose pavyzdžiuose buvo identifikuotas PMTV. Gauti rezultatai pavaizduoti grafiškai 12 paveiksle. Visuose šiuose indikatoriniuose augaluose, kuriuose ELISA metodu buvo identifikuotas PMTV, buvo pastebima sisteminė reakcija, sisteminė mozaika buvo išplitusi po visą *N. benthamiana* augalą.

3.5 Atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandininė reakcija (AT-PGR)

Polimerazinė grandininė reakcija – tai labai jautrus metodas, naudojamas virusų nustatymui ir identifikacijai. Šis metodas ypatingas tuo, kad galima identifikuoti virusą, esant labai mažai jo koncentracijai.

Daugumos augalų virusų nukleorūgštis yra RNR, todėl yra naudojamas modifikuotas PGR metodas – atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandininė reakcija (Matthews, 1992).

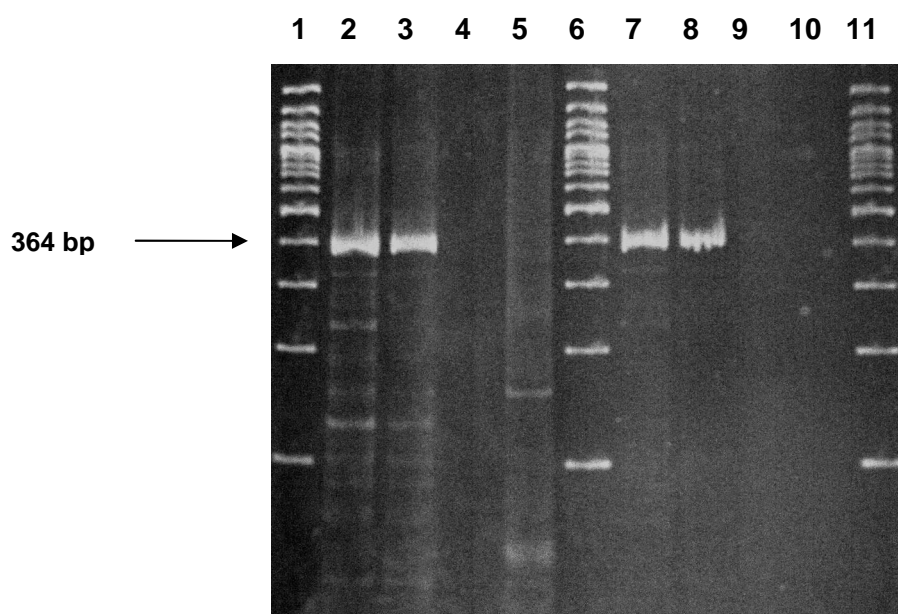
TRV identifikacija. TRV identifikavimui buvo naudojami indikatoriniai augalai, inokuliuoti TRV iš dekoratyvinių augalų. Šiame tyrime buvo naudota užšaldyta virusuota medžiaga: 1) *Nicotiana debneyi* LL (Iz. 0517) ir 2) *Nicandra physaloides* LL (Iz. 0517). Visuose augaluose-indikatoriuose buvo aptikti šiam virusui būdingi simptomai (vietinės žaizdos). Taip pat buvo naudojama neigiama ir vandens kontrolės.

Šiuo metodu buvo siekiama ne tik identifikuoti TRV, bet ir palyginti dvi PGR programas:

1. universali programa RNR turintiems augalų virusams;
2. specifinė, tik TRV būdinga programa.

13 paveikslas iliustruoja produktus, gautus AT-PGR metodu. Iš pateikto paveikslo matosi, kad abiejuose indikatoriniuose augaluose yra tiriamasis virusas (susidarė 364 bp produktas), kas atitinka literatūrinius duomenis (Weidemann, 1995).

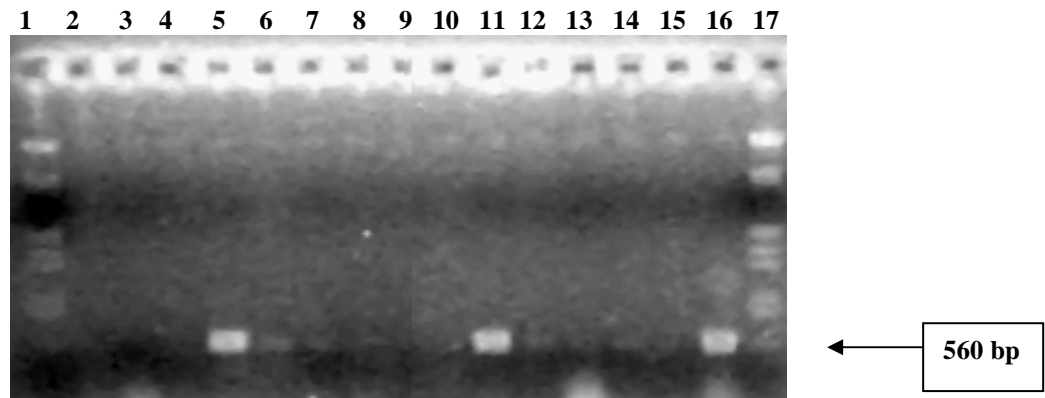
Taip pat buvo nustatyta, kad specifinė šiam virusui programa yra efektyvesnė negu universali visiems augalų RNR virusams programa. Specifinėje TRV programoje aptinkama kur kas mažiau priemaišų ir nespecifiškumų.



13 pav. AT-PGR rezultatai poliakrilamidiniame gelyje. 1, 6 ir 11 takeliuose markeris-gene rule, 2 ir 3 takeliai – Iz. 0517 *N.debneyi* (universali augalų virusų PGR programa), 4 takelis – K-, 5 takelis – K_{H_2O} , 7 ir 8 takeliai – Iz 0517 *N.debneyi* (speciali TRV PGR programa), 9 takelis – K-, 10 takelis – K_{H_2O} .

PMTV identifikacija. Vieno žingsnio AT-PGR metodu buvo identifikuotas PMTV. Tai jautrus ir labai greitai atliekamas metodas, kuriame atvirkštinės transkripcijos ir PGR reakcijos vyksta iš karto viename mėgintuvėlyje, vienos užprogramuotos programos metu.

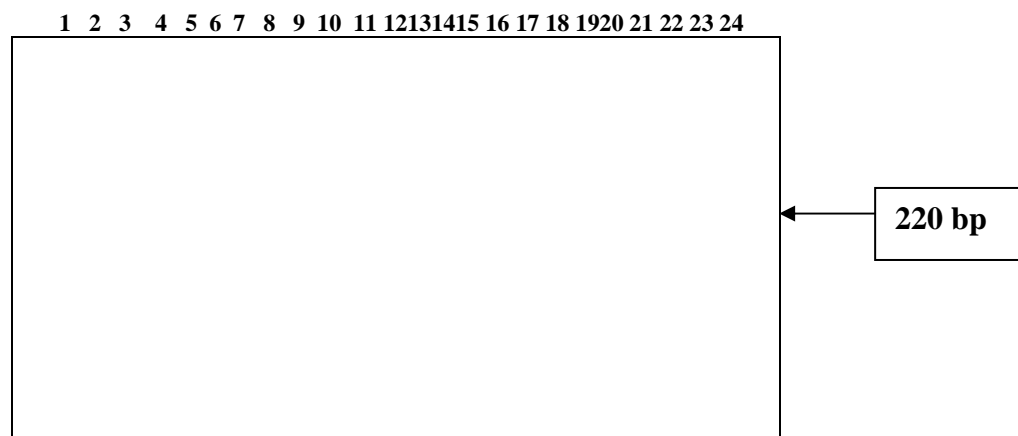
Tyrimui buvo pasirinkti bulvių gumbai (bulvių veislė – “Saturna”), kurių viduje buvo aptikti PMTV būdingi simptomai (rudi lankai bei žiedai). Atliktas vieno žingsnio PGR (tiksliai metodika ir darbo eiga yra aprašyta skyriuje “Metodai”), gauti rezultatai buvo analizuojami 1,5 % agarozės gelyje. Gauti AT-PGR produktai pateikti 14 paveiksle.



14 pav. Vieno žingsnio AT-PGR rezultatai 1,5 % agarozės gelyje. 1 ir 17 takeliuose markeris-gene rule, 2 – 13 takeliai – pavyzdžiai imti iš bulvių stiebagumbių. 14 takelis – K-, 15 takelis – K_{H2O}, 16 takelis – K+.

Teigiami rezultatai gauti tik dviejuose pavyzdžiuose – 4 ir 10 takeliuose (susidarė 560 bp produktas), kas atitinka literatūrinius duomenis (Sandgren, 1995). Šiame eksperimente buvo naudojamas λ DNR/EcoR1 + Hind III markeris, kurio bazių poros išsidėsto tokia tvarka: 21226 bp, 5148 bp, 4973 bp, 4268 bp, 3530 bp, 2027 bp, 1904 bp, 1584 bp, 1375 bp, 947 bp, 831 bp, 564 bp.

Taip pat buvo paimti tie patys pavyzdžiai (ta pati RNR, išskirta iš gumbų) ir atlikta AT-PGR, siekiant identifikuoti TRV. Iš gautų rezultatų, kurie yra pateikti 15 paveiksle galime pasakyti, kad daugelyje pavyzdžių kur buvo nustatytas PMTV, TRV nebuvo identifikuotas.



15 pav. Vieno žingsnio AT-PGR rezultatai 1,5 % agarozės gelyje. 1 ir 24 takeliuose markeris-gene rule, 2 – 21 takeliai – pavyzdžiai imti iš bulvių stiebagumbių. 22 takelis – K_{H2O}, 23 takelis – K+.

TRV virusas buvo nustytas visuose pavyzdžiuose išskyrus dviejuose (5 ir 18 takeliuose rezultatas buvo neigiamas, juose nebuvo aptikta TRV). Šiuose pavyzdžiuose buvo nustatytas PMTV.

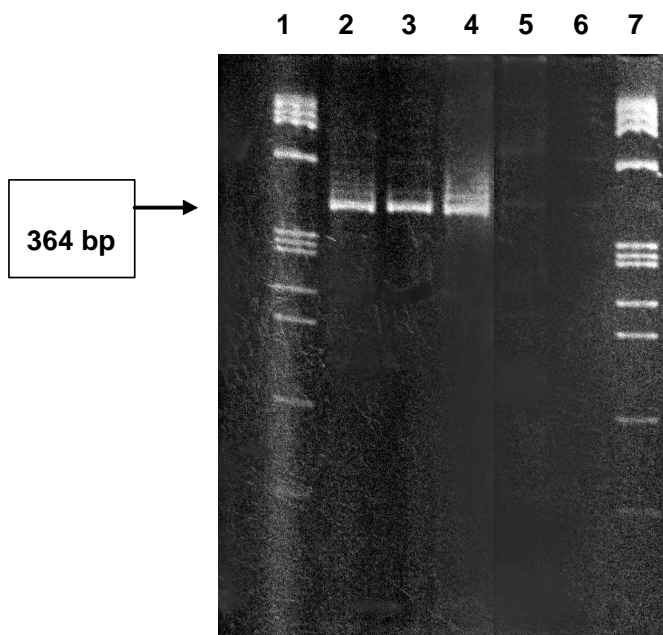
Iš bulvinių pavyzdžių AT-PGR, galima daryti kelias išvadas:

- ✓ abu virusai – PMTV bei TRV – dažnai aptinkami bulvėse,
- ✓ vizualiai identifikuoti koks tai virusas yra neįmanoma, nes abu šie virusai bulvių gumbuose sukelia tokius pačius simptomus,
- ✓ TRV yra paplitęs kur kas dažniau nei PMTV.

3.6 Serologiškai sugauto viruso atvirkštinės transkripcijos polimerazinė ciklinė reakcija (IC-AT-PGR)

IC-AT-PGR naudojamas augalų virusų identifikacijai, tai metodas, apjungiantis ELISA ir AT-PGR metodus. Nors teigiama, kad šis metodas nėra labai jautrus, tačiau jis palengvina viruso nustatymą, nes nereikalauja totalinės RNR išskyrimo iš tiriamų pavyzdžių.

TRV identifikacijai pasirinkta tiriamoji medžiaga - izoliatas 0517 iš *N. debneyi* (užšaldyta ir liofilizuota augalinė medžiaga). Šiuo metodu taip pat buvo norima palyginti ir išsiaiškinti, kuri medžiaga – liofilizuota ar užšaldyta – yra geresnė ir efektyvesnė. 16 paveiksle yra pateikti gauti rezultatai.



16 pav. IC-AT-PGR rezultatai poliakrilamidiniame gelyje. 1 ir 7 takeliuose markeris ϕ x 174/ HaeIII, 2-3 takeliai – Iz. 0517 *N.debneyi* (liofilizuota medžiaga), 4 takelis - Iz. 0517 *N.debneyi* (užšaldyta medžiaga), 5 takelis – K-, 6 takelis – K_{H2O}.

Gauti rezultatai rodo, kad tai efektyvus ir patikimas metodas TRV identifikavimui. Taip pat buvo nustatyta, kad nėra jokio skirtumo efektyvumo padidinimui naudojant šaldytą ar liofilizuotą medžiagą.

3.7 Grybo *Spongospora subterranea* infektyvumas ir produktyvumas

Eksperimentas buvo pradėtas Aarhus Universitete Žemės ūkio mokslų fakultete, Augalų Apsaugos Departmente Danijoje (Aarhus University, Faculty of Agricultural Science, Department of Plant Pathology) 2007 02 07 ir tęsėsi iki 2007 03 21. Tyrimui buvo imti 6 jauni (2 savaičių) augalai – pomidorai (*Lycopersicon esculentum* Mill.), kurie buvo infekuoti grybo *Spongospora subterranea* sporomis. Šie augalai buvo įvardinti: K₁1, K₁2, K₁3 bei K₃1, K₃2, K₃3.

Po savaitės infekuoti augalai buvo perkelti į stiklinėlę su vandeniu ir mineralinėmis medžiagomis. Kas antrą dieną buvo skaičiuojamos zoosporos ir apskaičiuojama jų koncentracija.

Po pirmų dviejų dienų zoosporų koncentracija nebuvo labai didelė. Koncentracija svyravo nuo 62,5 zoosporų/mL iki 2437,5 zoosporų/mL. Praėjus 3 dienom zoosporų koncentracija sparčiai padidėjo. Viename pavyzdyje koncentracija siekė net $538,13 \cdot 10^2$ zoosporų/mL. Praėjus savaitei nuo eksperimento pradžios zoosporų koncentracija kas kartą mažėdavo. Po 1 mėnesio (kai kuriuose pavyzdžiuose mažiau negu po mėnesio) zoosporų visai nebuvo aptikta. Gauti rezultatai pateikti 16 lentelėje, o grafiškai pavaizduota 17 paveiksle.

16 lentelė. Zoosporų koncentracijos kaita

KONC., zoosp/mL* 10 ²	K ₁ 1	K ₁ 2	K ₁ 3	K ₃ 1	K ₃ 2	K ₃ 3
DATA						
Vasario 09	0,62	24	2	6,25	0,625	7
Vasario 12	407,5	103,13	471,88	74,38	538,13	264,4
Vasario 14	615	64	296,88	141,25	250,63	161,25
Vasario 16	266,3	43,12	80	102,5	91,88	57,5
Vasario 18	70,63	40,63	26,25	69	27,5	28,75
Vasario 20	41,88	19,38	6,88	20,63	10	11,88
Vasario 22	8	0,625	7	4	2	5
Vasario 24	3	0,625	0	1,25	1,25	2,5
Vasario 26	0	0	0	0	0	0
Kovo 02	1,25	2	1,25	0	0,625	0
Kovo 05	1,25	1,25	0,625	0,625	0	0
Kovo 07	0	0	0	0	0	0
Kovo 09	0	0	0	0	0	0
Kovo 12	0	0	0	0	0	0
Kovo 15	0	0	0	0	0	0
Kovo 19	0	0	0	0	0	0
Kovo 21	0	0	0	0	0	0



17 pav. Zoosporų koncentracija tiriamuosiuose pomidorų augaluose

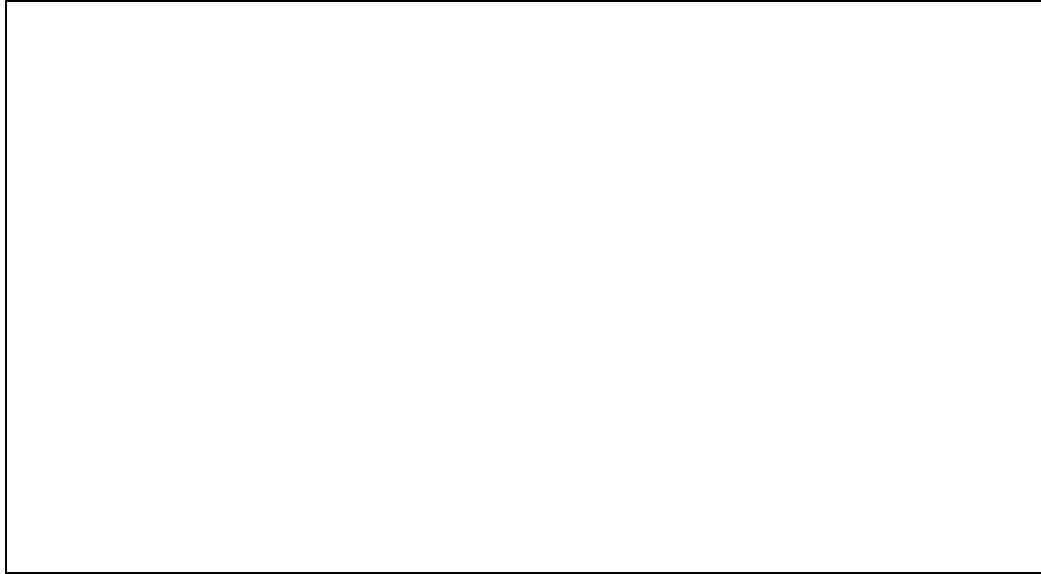
Kaip matosi iš pateikto grafiko 17 paveiksle, pradžioje zoosporų koncentracija labai sparčiai kilo ir maždaug po 5 dienų koncentracija pasiekdavo aukščiausią tašką. Praėjus maždaug 2 savaitėm koncentracija sparčiai mažėdavo, o kai kur pasiekdavo net 0. Po kai kurio laiko zoosporų koncentracija vėl pradėdavo kilti, tačiau šis kilimas buvo nežymus ir neilgalaikis, netrukus buvo pastebėtas spartus zoosporų produkcijos sumažėjimas.

Išsamesni ir detalesni kiekvieno tiriamo pavyzdžio rezultatai yra pateikti ir apibūdinti žemiau esančiuose paveiksluose.



18 pav. Zoosporų koncentracija tiriamajame K₁1 pomidoro augale

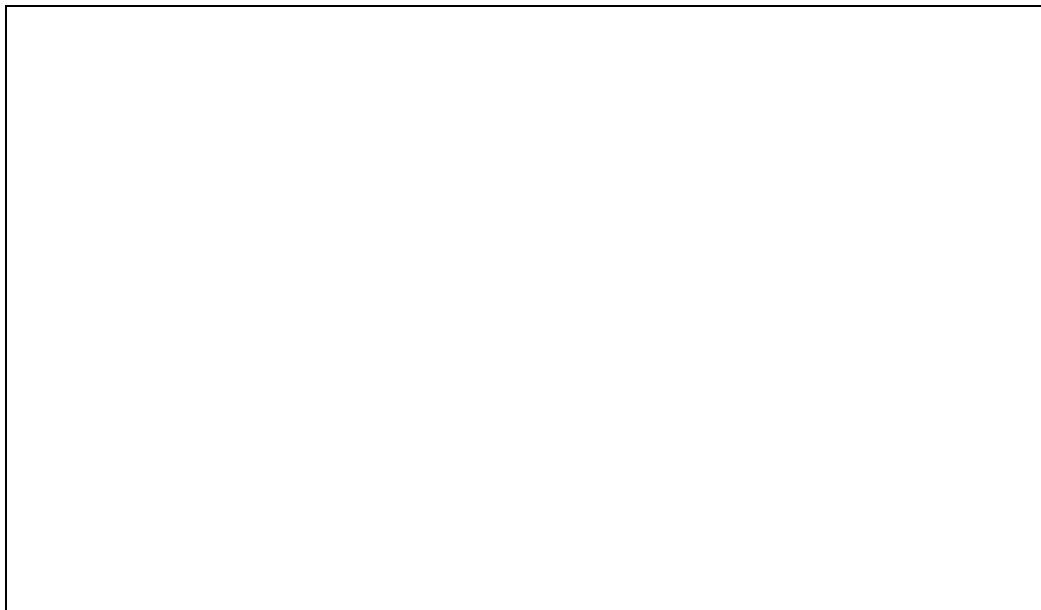
Pirmame augale K₁1 didžiausia zoosporų koncentracija buvo pasiekta praėjus 7 dienom po eksperimento pradžios. Praėjus dar 2 dienom zoosporų koncentracija sparčiai sumažėjo, zoosporų buvo suskaičiuojama beveik dvigubai mažiau nei prieš kelias dienas. Toliau zoosporų koncentracija vis mažėdavo.



19 pav. Zoosporų koncentracija tiriamajame K₁2 pomidoro augale

Antrame pomidoro augale K₁2 jau praėjus 1 dienai nuo eksperimento pradžios buvo aptikta didelė grybo *Spongospora subterranea* zoosporų koncentracija, kuri siekė $24 \cdot 10^2$ zoosporų/mL. Didžiausias pikas buvo nustatytas praėjus 5 dienom nuo eksperimento pradžios. Po 1 savaitės koncentracija kaskart pradėdavo mažėti. Nuo vasario 16 dienos iki vasario 18 dienos zoosporų koncentracijos pokytis nebuvo ryškiai ženklus.

Kaip ir kituose pomidorų augaluose zoosporų koncentracija pasiekdavo 0, praėjus maždaug 1 mėnesiui.



20 pav. Zoosporų koncentracija tiriamajame K₁3 pomidoro augale

Trečiame augale K₁3 praėjus 1 dienai nuo eksperimento pradžios buvo nustatyta nedidelė zoosporų koncentracija, apie $2 \cdot 10^2$ zoosporų/mL. Po dar dviejų dienų koncentracija labai

padidėjo ir pasiekė maksimumo tašką. Ji siekė net $471,88 \cdot 10^2$ zoosporų/mL. Beveik visuose tiriamuosiuose augaluose maksimumo taškas, t. y. didžiausia zoosporų koncentracija, buvo nustatyta praėjus 5 dienom nuo eksperimento pradžios. Ir maždaug po savaitės koncentracija pradėdavo mažėti.



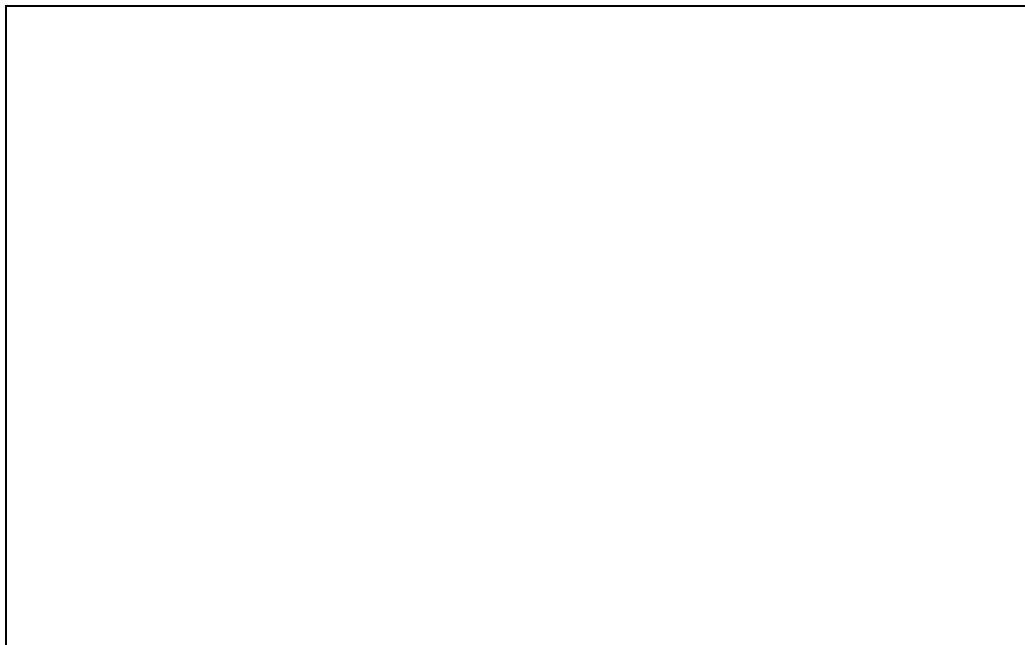
21 pav. Zoosporų koncentracija tiriamajame K₃₁ pomidoro augale

K₃₁ augale zoosporų koncentracija iš pradžių didėjo palaipsniui. Didžiausia koncentracija buvo nustatyta praėjus savaitei nuo eksperimento pradžios. Ji palyginus su kitų augalų pasiektomis didžiausiomis koncentracijomis nėra aukšta. Šio augalo maksimali zoosporų koncentracija siekia $141,25 \cdot 10^2$ zoosporų/mL, tuo tarpu kai aukščiausia koncentracija K₁₁ augale buvo nustatyta net $615 \cdot 10^2$ zoosporų/mL.



22 pav. Zoosporų koncentracija tiriamajame K₃₂ pomidoro augale

Kitame augale K₃₂ praėjus 1 dienai nuo eksperimento pradžios koncentracija buvo labai nedidelė, tik $0,625 \cdot 10^2$ zoosporų/mL. Kaip ir kituose tiriamuosiuose augaluose, koncentracijos maksimumas buvo pasiektas po 5 dienų, o po savaitės koncentracija vis mažėdavo.



23 pav. Zoosporų koncentracija tiriamajame K₃₃ pomidoro augale

Šiame augale (K₃₃) po 1 dienos koncentracija pasiekė $7 \cdot 10^2$ zoosporų/mL. Didžiausia koncentracija buvo pasiekta praėjus 5 dienom nuo eksperimento pradžios. Mažiau nei po mėnesio (2007 03 02) jau visai nebuvo aptikta zoosporų, koncentracija lygi 0.

Gauti rezultatai parodė, kad pačiomis pirmomis eksperimento dienomis zoosporų koncentracija nebuvo labai didelė, mat reikia laiko, kad susiformuotų zoosporangė, kuri galėtų produkuoti zoosporas. Praėjus maždaug 5 dienom (kai kuriuose augaluose 7 dienom) buvo aptikta didžiausia zoosporų koncentracija. Po šio laikotarpio zoosporų apskaičiuojama kaskart mažiau, koncentracija palaipsniui mažėja, kol maždaug po mėnesio zoosporų koncentracija tampa lygi 0. Pagal šį eksperimentą galima spręsti, kada grybas *Spongospora subterranea* labiausiai yra infektyvus, kada jis gali daugiausiai infekuoti naujų šaknų. Buvo nustatyta, kad efektyviausias produkcinis laikotarpis yra maždaug 5 dienos nuo zoosporangių susiformavimo. Taip pat buvo nustatyta, kad šis grybas negali produkuoti zoosporų ilgiau nei mėnesį.

Yra žinoma, kad vienas augalas negali pastoviai produkuoti zoosporų, nors ir nuolat užauga naujos jaunos šaknys, kurios galėtų toliau būti infekuojamos grybo zoosporomis bei tęsti tolesnį zoosporų produkavimą. Kodėl taip vyksta tiksliai nežinoma, atsakymo į šį klausimą dar nėra, priežastys dar neišaiškintos.

Šiuo eksperimentu taip pat buvo nustatyta augalo infekcija, kurią sukėlė *Spongospora subterranea*. Kiekvieną savaitę (eksperimentas truko 6 savaites) buvo paimama dalis *Lycopersicon esculentum* Mill. augalų šaknų, paruošiami preparatai (detalesnė eiga yra aprašyta skyrelyje “Metodai”). Mikroskopu žiūrima, kiek zoosporangių yra augalo šaknyse ir, pasitelkdami Kole skalę (Kole, 1954), nustatome augalo infekcijos laipsnį. Iš šio eksperimento galima pasakyti, kada grybas yra infektyviausias, kuriuo laikotarpiu jis gali labiausiai infekuoti naujas augalo šaknis. Iš gautų rezultatų, kurie yra apibendrinti ir pateikti 17 bei 18 lentelėse galime teigti, kad *Spongospora subterranea* labiausiai infekuoja augalus ir juose sukelia silpnas ar vidutinės infekcijas praėjus savaitei ar dviem savaitėm nuo zoosporangių susiformavimo. Vėliau infektyvumo laipsnis vis mažėja ir maždaug 5 savaitę grybas jau nebesugeba infekuoti augalo, neaptinkama zoosporangių, nebeprodukuojamos zoosporos. Gauti rezultatai taip pat yra apibendrinti grafiškai, 24 paveiksle.

17 lentelė. Infekcijos nustatymas 1-3 savaitę nuo zoosporangės susiformavimo

1 savaitė	K ₁ 1 – 2	2 savaitė	K ₁ 1 – 2	3 savaitė	K ₁ 1 – 1
	K ₁ 2 – 1		K ₁ 2 – 3		K ₁ 2 – 1
	K ₁ 3 – 1		K ₁ 3 – 2		K ₁ 3 – 1
	K ₃ 1 – 2		K ₃ 1 – 2		K ₃ 1 – 0
	K ₃ 2 – 1		K ₃ 2 – 2		K ₃ 2 – 0
	K ₃ 3 – 1		K ₃ 3 – 1		K ₃ 3 – 0

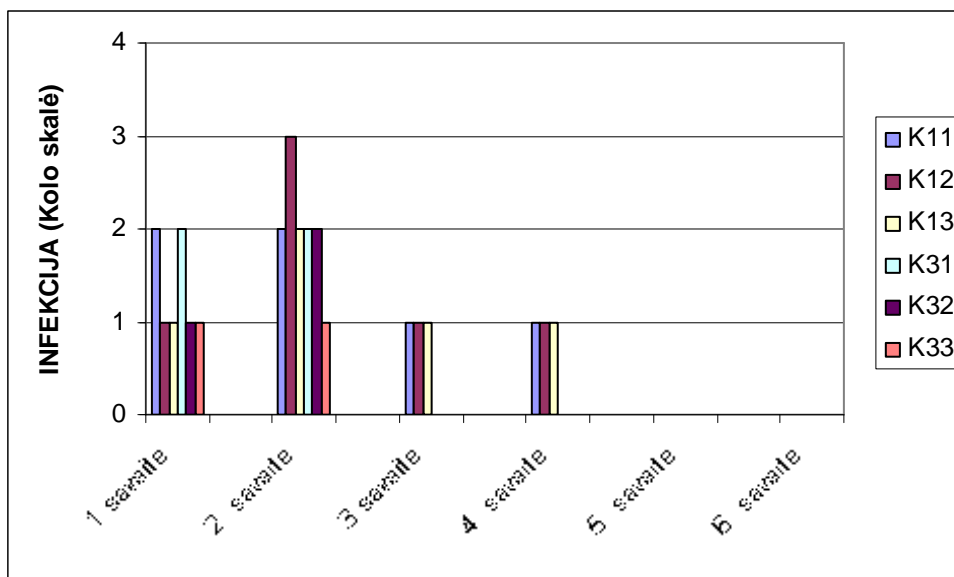
18 lentelė. Infekcijos nustatymas 4-6 savaitę nuo zoosporangės susiformavimo

4 savaitė	K ₁ 1 – 1	5 savaitė	K ₁ 1 – 0	6 savaitė	K ₁ 1 – 0
	K ₁ 2 – 1		K ₁ 2 – 0		K ₁ 2 – 0
	K ₁ 3 – 1		K ₁ 3 – 0		K ₁ 3 – 0
	K ₃ 1 – 0		K ₃ 1 – 0		K ₃ 1 – 0
	K ₃ 2 – 0		K ₃ 2 – 0		K ₃ 2 – 0
	K ₃ 3 – 0		K ₃ 3 – 0		K ₃ 3 – 0

Infekcijos nustatymas (Kole, 1954)

Kolo skalė:

- 0 – nėra zoosporangių – nėra infekcijos;
- 1 – kelios zoosporangės – labai silpna infekcija;
- 2 – kelios šaknys su zoosporangėmis – silpna infekcija;
- 3 - daug zoosporangių visose šaknyse - vidutinė infekcija.
- 4 – labai daug zoosporangių, aptinkama visose šaknyse - sunki infekcija



24 pav. Grafinis infekcijos pavaizdavimas 1-6 savaites.

Šio eksperimento metu taip pat buvo nustatyta koreliacija tarp zoosporų koncentracijos bei infekcijos laipsnio: kuo daugiau augale yra aptinkama zoosporangių (pagal zoosporanges nustatomas infekcijos laipsnis), kuo sunkesnė yra infekcija, tuo daugiau yra produkuojama zoosporų.

3.8 PMTV plitimo greitis indikatoriniuose augaluose

Šiame eksperimente buvo siekiama nustatyti PMTV plitimo greitį skirtinguose indikatoriniuose augaluose. Žiūrima kaip greitai virusas keliauja nuo inokuliuotų lapų į vidurinius, viršutinius lapus bei kaip greitai jis infekuoja augalo šaknis. Augalai – indikatoriai buvo inokuliuoti PMTV ir šie tikrinami ELISA metodu kas trečią dieną (eksperimentas vyko 23 dienas, kas trečią dieną buvo atliekama PMTV identifikacija, panaudojant ELISA metodą. Iš viso 8 kartus buvo atliekamas viruso identifikavimas). Imami vienos rūšies 3 inokuliuoti augalai bei 1 sveikas augalas, kuris naudojamas kaip neigiama kontrolė. Iš viso buvo atliekama PMTV identifikacija 8 kartus. PMTV plitimo greitis indikatoriniuose augaluose (*Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana debneyi*) apibendrintas 19-22 lentelėse.

19 lentelė. PMTV plitimo greitis indikatoriniame augale *Nicotiana clevelandii*

Diena	Augalas	Pavyzdys	Rezultatas	Simptomai
3 dienos po inokuliacijos (1)	<i>Nicotiana clevelandii</i>	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	0/3	-
		Inokuliuoti lapai	3/3	-

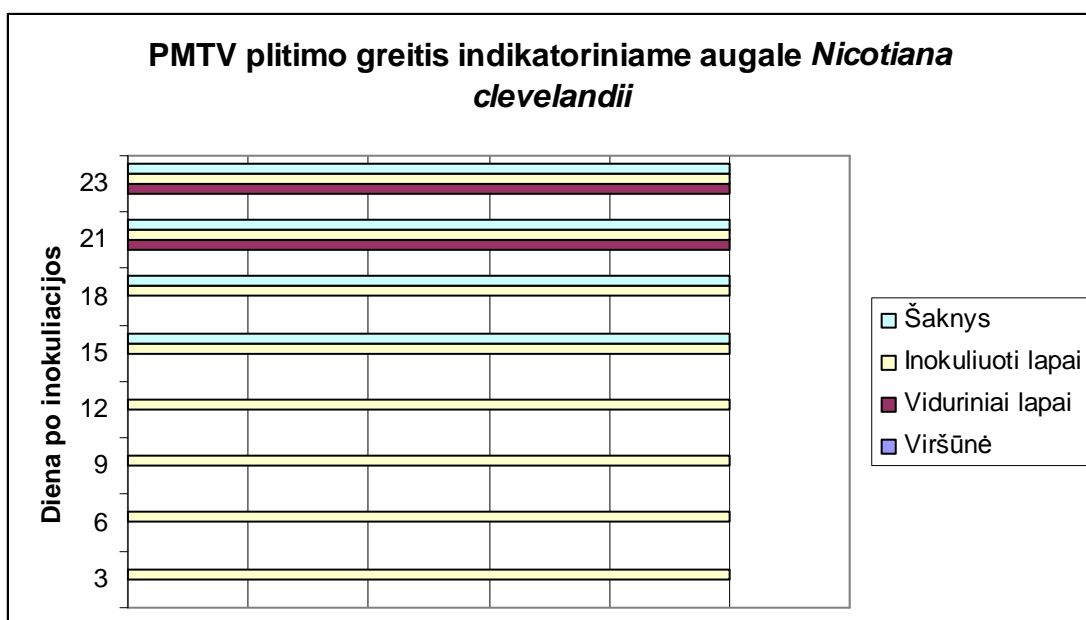
		Šaknys	0/3	-
	<i>Nicotiana clevelandii</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
6 dienos po inokuliacijos (2)	<i>Nicotiana clevelandii</i>	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	0/3	-
		Inokuliuoti lapai	2/3	-
		Šaknys	0/3	-
	<i>Nicotiana clevelandii</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
9 dienos po inokuliacijos (3)	<i>Nicotiana clevelandii</i>	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	0/3	-
		Inokuliuoti lapai	3/3	-
		Šaknys	0/3	-
	<i>Nicotiana clevelandii</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
12 dienų po inokuliacijos (4)	<i>Nicotiana clevelandii</i>	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	0/3	-
		Inokuliuoti lapai	2/3	+
		Šaknys	0/3	-
	<i>Nicotiana clevelandii</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
15 dienų po inokuliacijos (5)	<i>Nicotiana clevelandii</i>	Viršutiniai lapai	0/3	-

		Viduriniai lapai	0/3	-
		Inokuliuoti lapai	2/3	+
		Šaknys	2/3	-
	<i>Nicotiana clevelandii</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
18 dienų po inokuliacijos (6)	<i>Nicotiana clevelandii</i>	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	0/3	-
		Inokuliuoti lapai	3/3	+
		Šaknys	2/3	-
	<i>Nicotiana clevelandii</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
21 diena po inokuliacijos (7)	<i>Nicotiana clevelandii</i>	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	2/3	+
		Inokuliuoti lapai	2/3	-
		Šaknys	2/3	-
	<i>Nicotiana clevelandii</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
23 dienos po inokuliacijos (8)	<i>Nicotiana clevelandii</i>	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	3/3	-
		Inokuliuoti lapai	2/3	+
		Šaknys	2/3	-
	<i>Nicotiana clevelandii</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-

		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-

“+” – augale buvo pastebėti simptomai; “-“ – augale nebuvo aptikti simptomai; 0/3, 1/3, 3/3, 2/3 - tai parodo keliuose augaluose iš 3 eksperimente naudojamų buvo identifikuotas PMTV; 0/1 – kaip neigiama kontrolė naudojamas 1 augalas ir jame nebuvo identifikuotas PMTV.

Nicotiana clevelandii indikatoriniame augale jau praėjus 3 dienom po inokuliacijos, ELISA metodu buvo identifikuotas PMTV egzistavimas, buvo gauti teigiami rezultatai, nors vizualiai jokių simptomų nebuvo pastebėta. Simptomai išryškėjo kur kas vėliau, praėjus 12 dienų po inokuliacijos, kai kuriuose augaluose buvo pastebėtos kelios vietinės žaizdos. Praėjus 15 dienų po inokuliacijos, virusas jau buvo identifikuotas šaknyse, tačiau praėjus 23 dienom po inokuliacijos PMTV vis dėlto nebuvo aptiktas visame augale, jis nebuvo identifikuotas viršutiniuose augalo lapuose.



25 pav. PMTV plitimo greitis indikatoriniame augale *Nicotiana clevelandii*

20 lentelė. PMTV plitimo greitis indikatoriniame augale *Nicotiana benthamiana*

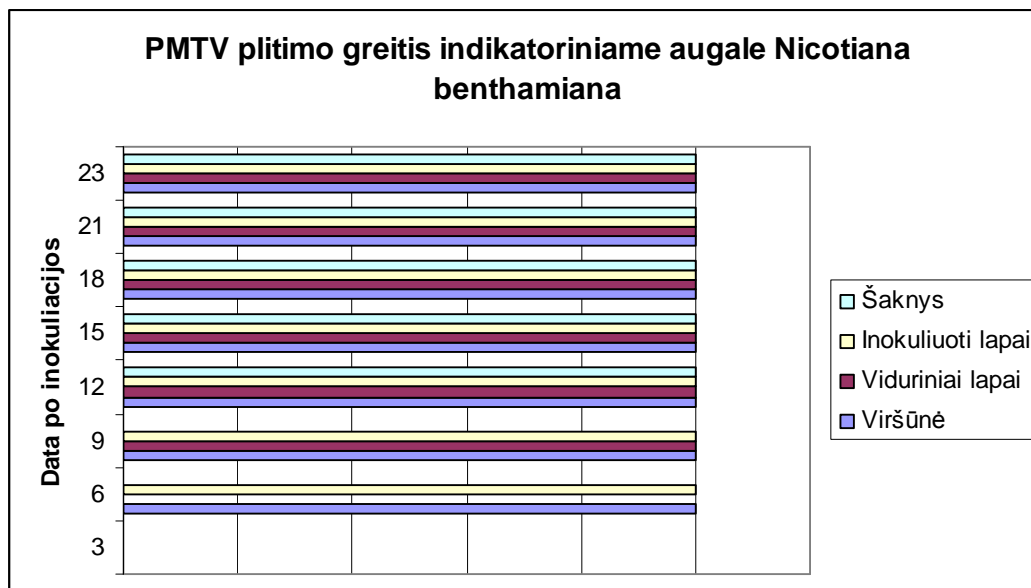
Diena	Augalas	Pavyzdys	Rezultatas	Simptomai
3 dienos po inokuliacijos (1)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	0/3	-
		Inokuliuoti lapai	0/3	-
		Šaknys	0/3	-
	<i>Nicotiana benthamiana</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-

		Šaknys	0/1	-
6 dienos po inokuliacijos (2)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Viršutiniai lapai	1/3	-
		Viduriniai lapai	0/3	-
		Inokuliuoti lapai	2/3	-
		Šaknys	0/3	-
	<i>Nicotiana benthamiana</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
9 dienos po inokuliacijos (3)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Viršutiniai lapai	2/3	+
		Viduriniai lapai	1/3	+
		Inokuliuoti lapai	2/3	+
		Šaknys	0/3	-
	<i>Nicotiana benthamiana</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
12 dienų po inokuliacijos (4)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Viršutiniai lapai	2/3	+
		Viduriniai lapai	3/3	+
		Inokuliuoti lapai	2/3	+
		Šaknys	2/3	-
	<i>Nicotiana benthamiana</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
15 dienų po inokuliacijos (5)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Viršutiniai lapai	3/3	+
		Viduriniai lapai	2/3	+
		Inokuliuoti lapai	3/3	+
		Šaknys	2/3	-
	<i>Nicotiana benthamiana</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-

		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
18 dienų po inokuliacijos (6)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Viršutiniai lapai	3/3	+
		Viduriniai lapai	3/3	+
		Inokuliuoti lapai	3/3	+
		Šaknys	2/3	-
	<i>Nicotiana benthamiana</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
21 diena po inokuliacijos (7)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Viršutiniai lapai	3/3	+
		Viduriniai lapai	3/3	+
		Inokuliuoti lapai	3/3	+
		Šaknys	3/3	-
	<i>Nicotiana benthamiana</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
23 dienos po inokuliacijos (8)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Viršutiniai lapai	2/3	+
		Viduriniai lapai	3/3	+
		Inokuliuoti lapai	3/3	+
		Šaknys	3/3	-
	<i>Nicotiana benthamiana</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-

“+” – augale buvo pastebėti simptomai; “-“ – augale nebuvo aptikti simptomai; 0/3, 1/3, 3/3, 2/3 - tai parodo keliuose augaluose iš 3 eksperimente naudojamų buvo identifikuotas PMTV; 0/1 – kaip neigiama kontrolė naudojamas 1 augalas ir jame nebuvo identifikuotas PMTV.

Kaip buvo nustatyta iš šio eksperimento, greičiausiai virusas plina indikatoriniame augale - *Nicotiana benthamiana*. Jau praėjus 6 dienom po inokuliacijos PMTV buvo identifikuotas ne tik inokuliuotuose lapuose, bet taipogi ir viršutiniuose lapuose. Praėjus 9 dienom po inokuliacijos išryškėjo sisteminė reakcija, sisteminė mozaika buvo išplitusi po visą augalą. PMTV taip pat buvo identifikuotas ELISA metodu tiek viršutiniuose, tiek viduriniuose, tiek ir inokuliuotuose lapuose. Tik šaknyse šis virusas buvo nustatytas praėjus 12 dienų po inokuliacijos.



26 pav. PMTV plitimo greitis indikatoriniame augale *Nicotiana benthamiana*

21 lentelė. PMTV plitimo greitis indikatoriniame augale *Nicotiana tabacum* "Xanthi"

Diena	Augalas	Pavyzdys	Rezultatas	Simptomai
3 dienos po inokuliacijos (1)	<i>Nicotiana tabacum</i> "Xanthi"	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	0/3	-
		Inokuliuoti lapai	0/3	-
		Šaknys	0/3	-
6 dienos po inokuliacijos (2)	<i>Nicotiana tabacum</i> "Xanthi" (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
6 dienos po inokuliacijos (2)	<i>Nicotiana tabacum</i> "Xanthi"	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	0/3	-
		Inokuliuoti lapai	3/3	-
		Šaknys	0/3	-

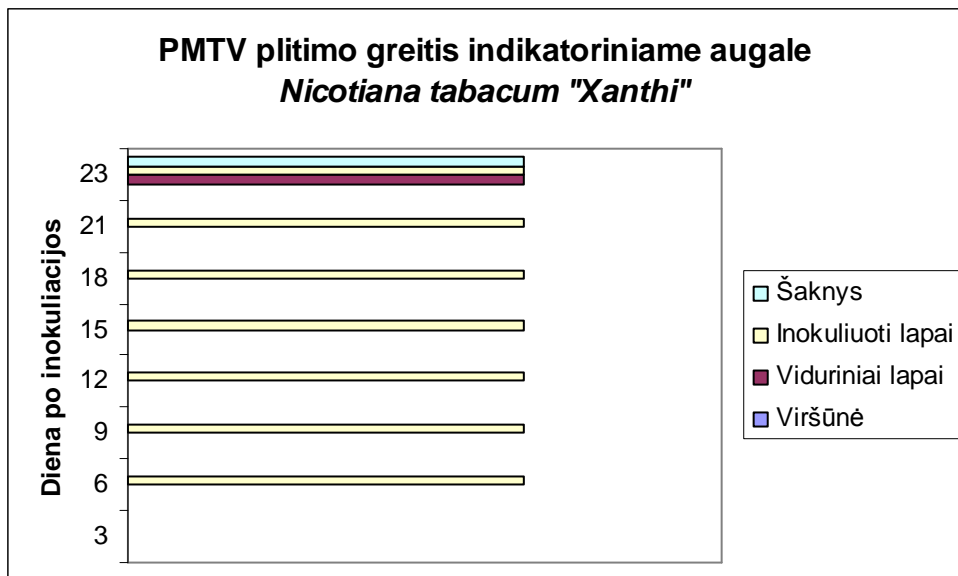
	<i>Nicotiana tabacum</i> "Xanthi" (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
9 dienos po inokuliacijos (3)	<i>Nicotiana tabacum</i> "Xanthi"	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	0/3	-
		Inokuliuoti lapai	3/3	-
		Šaknys	0/3	-
	<i>Nicotiana tabacum</i> "Xanthi" (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
12 dienų po inokuliacijos (4)	<i>Nicotiana tabacum</i> "Xanthi"	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	0/3	-
		Inokuliuoti lapai	3/3	-
		Šaknys	0/3	-
	<i>Nicotiana tabacum</i> "Xanthi" (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
15 dienų po inokuliacijos (5)	<i>Nicotiana tabacum</i> "Xanthi"	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	0/3	-
		Inokuliuoti lapai	3/3	-
		Šaknys	0/3	-
	<i>Nicotiana tabacum</i> "Xanthi" (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
18 dienų po inokuliacijos (6)	<i>Nicotiana tabacum</i> "Xanthi"	Viršutiniai lapai	0/3	-

		Viduriniai lapai	0/3	-
		Inokuliuoti lapai	3/3	+
		Šaknys	0/3	-
	<i>Nicotiana tabacum</i> "Xanthi" (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
21 diena po inokuliacijos (7)	<i>Nicotiana tabacum</i> "Xanthi"	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	0/3	-
		Inokuliuoti lapai	3/3	+
		Šaknys	0/3	-
	<i>Nicotiana tabacum</i> "Xanthi" (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
23 dienos po inokuliacijos (8)	<i>Nicotiana tabacum</i> "Xanthi"	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	2/3	-
		Inokuliuoti lapai	3/3	+
		Šaknys	0/3	-
	<i>Nicotiana tabacum</i> "Xanthi" (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-

“+” – augale buvo pastebėti simptomai; “-“ – augale nebuvo aptikti simptomai; 0/3, 1/3, 3/3, 2/3 - tai parodo keliuose augaluose iš 3 eksperimente naudojamų buvo identifikuotas PMTV; 0/1 – kaip neigiama kontrolė naudojamas 1 augalas ir jame nebuvo identifikuotas PMTV.

Indikatoriniame augale *Nicotiana tabacum* "Xanthi" PMTV buvo identifikuotas inokuliuotuose lapuose praėjus 6 dienom po inokuliacijos. Nors virusas buvo identifikuotas ELISA metodu, bet augale nebuvo aptikta jokių viruso sukeltų simptomų. Simptomai išryškėjo tik praėjus 18 dienai po inokuliacijos, inokuliuotuose lapuose buvo pastebimos kelios vietinės žaizdos. Praėjus 23 dienom po inokuliacijos, PMTV buvo identifikuotas ir viduriuniuose augalo

lapuose. Viruso plitimo greitis *Nicotiana tabacum* "Xanthi" indikatoriniame augale grafiškai pavaizduotas 27 paveiksle.



27 pav. PMTV plitimo greitis indikatoriniame augale *Nicotiana tabacum* "Xanthi"

22 lentelė. PMTV plitimo greitis indikatoriniame augale *Nicotiana debneyi*

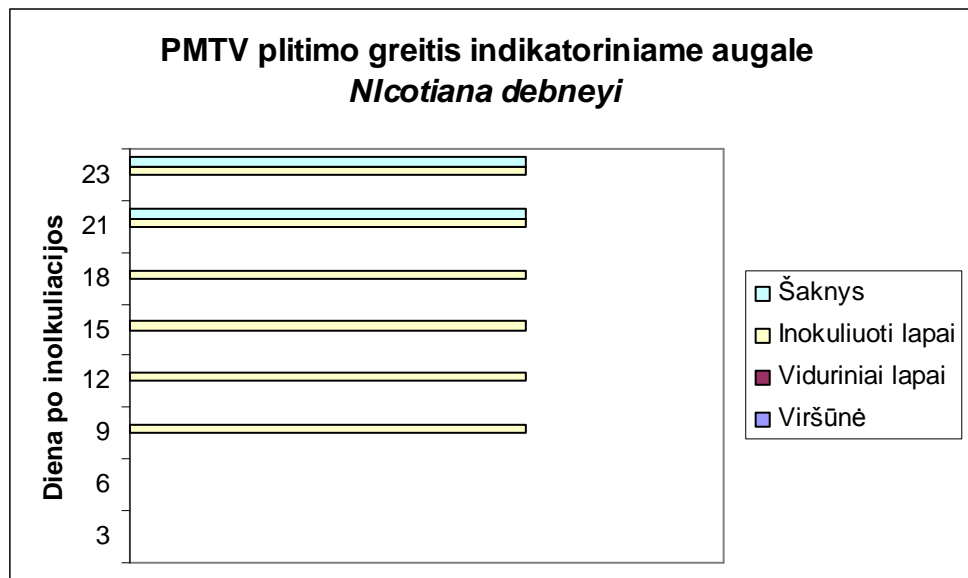
Diena	Augalas	Pavyzdys	Rezultatas	Simptomai
3 dienos po inokuliacijos (1)	<i>Nicotiana debneyi</i>	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	0/3	-
		Inokuliuoti lapai	0/3	-
		Šaknys	0/3	-
6 dienos po inokuliacijos (2)	<i>Nicotiana debneyi</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
9 dienos po inokuliacijos (3)	<i>Nicotiana debneyi</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
9 dienos po inokuliacijos (4)	<i>Nicotiana debneyi</i>	Viršutiniai lapai	0/3	-

inokuliacijos (3)				
		Viduriniai lapai	0/3	-
		Inokuliuoti lapai	1/3	-
		Šaknys	0/3	-
	<i>Nicotiana debneyi</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
12 dienų po inokuliacijos (4)	<i>Nicotiana debneyi</i>	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	0/3	-
		Inokuliuoti lapai	1/3	-
		Šaknys	0/3	-
	<i>Nicotiana debneyi</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
15 dienų po inokuliacijos (5)	<i>Nicotiana debneyi</i>	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	0/3	-
		Inokuliuoti lapai	3/3	-
		Šaknys	0/3	-
	<i>Nicotiana debneyi</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
18 dienų po inokuliacijos (6)	<i>Nicotiana debneyi</i>	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	0/3	-
		Inokuliuoti lapai	3/3	-
		Šaknys	0/3	-
	<i>Nicotiana debneyi</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-

		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
21 diena po inokuliacijos (7)	<i>Nicotiana debneyi</i>	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	3/3	-
		Inokuliuoti lapai	3/3	+
		Šaknys	0/3	-
	<i>Nicotiana debneyi</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-
23 dienos po inokuliacijos (8)	<i>Nicotiana debneyi</i>	Viršutiniai lapai	0/3	-
		Viduriniai lapai	3/3	-
		Inokuliuoti lapai	3/3	+
		Šaknys	0/3	-
	<i>Nicotiana debneyi</i> (sveikas augalas, K-)	Viršutiniai lapai	0/1	-
		Viduriniai lapai	0/1	-
		Inokuliuoti lapai	0/1	-
		Šaknys	0/1	-

“+” – augale buvo pastebėti simptomai; “-“ – augale nebuvo aptikti simptomai; 0/3, 1/3, 3/3, 2/3 - tai parodo keliuose augaluose iš 3 eksperimente naudojamų buvo identifikuotas PMTV; 0/1 – kaip neigiama kontrolė naudojamas 1 augalas ir jame nebuvo identifikuotas PMTV.

Indikatoriniame augale *Nicotiana debneyi* praėjus 9 dienom po inokuliacijos buvo identifikuotas PMTV ELISA metodu, nors šiame augale nebuvo aptikta jokių šiam virusui būdingų simptomų. PMTV pradžioje buvo identifikuotas tik šiuo virusu inokuliuotuose lapuose ir tik vėliau, praėjus 21 dienai po inokuliacijos šis virusas buvo rastas ir identifikuotas viduriniuose augalo lapuose. Taip pat praėjus 21 dienai po inokuliacijos išryškėjo ir šiam virusui būdingi simptomai, inokuliuotuose augalo lapuose buvo aptiktos kelio vietinės žaizdos. Grafinis PMTV plitimo greitis šiame indikatoriniame augale yra pavaizduotas 28 paveiksle.



28 pav. PMTV plitimo greitis indikatoriniame augale *Nicotiana debneyi*

Šiuo eksperimentu buvo siekiama išsiaiškinti, kaip greitai virusas infekuoja visą augalą, pradedant inokuliuotais lapais, kylant aukščiau į vidurinius bei viršutinius lapus bei kaip greitai virusą galima identifikuoti augalo šaknyse. Šis eksperimentas buvo atliktas su indikatoriniais augalais kurie yra jautrūs šiam virusui. Tikimasi, kad panašus PMTV plitimo greitis turėtų būti ir natūraliame PMTV šeimininke – *Solanum tuberosum* L. Yra manoma, kad praėjus mažiau kaip vienam mėnesiui virusas gali infekuoti visą augalą nuo viršūnės iki šaknų, virusas išplinta po visą augalą. Šiuo eksperimentu buvo įrodyta, kad PMTV skirtingai plinta indikatoriniuose augaluose. Vienuose augaluose, pavyzdžiui *Nicotiana benthamiana*, PMTV plinta labai greitai, jau praėjus 12 dienų po inokuliacijos PMTV buvo identifikuotas visame augale, tiek viršūnėje, tiek ir augalo šaknyse. Tačiau kituose indikatoriniuose augaluose, tokiuose kaip *N. debneyi* ar *N. tabacum* viruso plitimo greitis nustatytas kur kas lėtesnis. Praėjus mažiau nei mėnesiui PMTV šiuose augaluose buvo identifikuotas tik inokuliuotuose ir viduriniuose lapuose. Indikatorinis augalas *N. clevelandii* išsiskyrė iš kitų augalų tuom, kad pirmiausiai PMTV buvo identifikuotas inokuliuotuose lapuose, o paskui šis virusas plito žemyn, į šaknis.

Šis atliktas eksperimentas parodė, kad PMTV gana greitai plinta augaluose, todėl su šiuo patogenu kovoti yra būtina, nes jis gali sukelti labai didelių problemų daugeliui augalų, o ypač svarbiam kultūriniam augalui – bulvei.

IŠVADOS

1. Nustatytas tiriamų TRV bei PMTV izoliatų pažeidžiamų augalų spektras bei sukeliama simptomai. PMTV infekuoja siaurą augalų – šeimininkų spektrą palyginus su TRV.
2. TRV ir PMTV buvo nustatyti teigiamomis serologinėmis reakcijomis (DAS-ELISA) bei jų identifikacija buvo patvirtinta skirtingais PGR metodais (dviejų bei vieno žingsnio AT-PRG, universali augalų virusams AT-PGR, IC-AT-PGR).
3. Gautas išgrynintas *Tobacco rattle virus* preparatas, kuriame elektroninės mikroskopijos pagalba buvo aptiktos charakteringos, lazdelės formos su kanalu viduje dalelės.
4. Nustatyta, kad PMTV greičiausiai plinta *N. benthamiana* bei *N. clevelandii* indikatoriniuose augaluose, o lėčiausiai – *N. debneyi* ir *N. tabacum* "Xanthi". Didžiausia vektoriaus *Spongospora subterranea* zoosporų koncentracija 5-7 dienos nuo zoosporų produkavimo pradžios. Išaiškintas trijų stiprumo tipų grybo infektyvumas, panaudojant Kole skalę.

Darbą atliko: Jurgita Rimkevičiūtė

Darbo vadovai: habil. dr. J.B.Staniulis

dr.Steen Lykke Nielsen

SANTRAUKA

Potato mop-top virus, priklausantis *Pomovirus* genčiai ir *Tobacco rattle virus*, priklausantis *Tobravirus* genčiai – tai dirvožemiu plintantys virusai. Tai patogenai, kurie plačiai paplitę pasaulyje. Pastaruoju metu vis labiau susidomėta šiais virusais, mat jie sukelia daug žalos daugeliui augalų, tame tarpe ir labai svarbių kultūrinių augalų. Su šiais patogenais kovoti yra labai sudėtinga, taigi iškyla labai rimta problema, kurią bandoma išspręsti. Todėl šiame darbe ir buvo siekiama susipažinti su šiais virusais, jų pernešėjais bei padaryti pirmuosius žingsnius, ieškant būdus kovai su šiais patogenais.

PMTV – tai patogenas, kuriam nebūdingas gausus šeimininkų ratas. Jis infekuoja tik nedaugelį augalų rūšių. Tai viena iš savybių, kuria skiriasi nuo TRV. Pastarasis priešingai, pasižymi didele augalų-šeimininkų gausa. Šie virusai labai panašūs tuom, kad daugelyje augalų jie sukelia panašius simptomus bei pažeidimus. Net indikatoriniuose augaluose jų sukeltos žaizdos yra labai panašios. Taigi, susiduriama su problema, mat identifikuoti juos vizualiai yra labai sudėtinga. Tik *N. benthamiana* indikatorinis augalas gali padėti atskirti šiuos virusus: PMTV jame sukelia sisteminę reakciją, sisteminė mozaika išplinta po visą augalą, o TRV sukelia tik vietines žaizdas.

Šiame baigiamajame darbe buvo siekiama identifikuoti PMTV bei TRV molekuliniais metodais. Identifikacijoje buvo pritaikytas imunofermentinis metodas – ELISA. Buvo nustatyta, kad šis metodas labiau tinka identifikuoti PMTV nei TRV, o kiti molekuliniai metodai, tokie kaip kelių rūšių AT-PGR, IC-AT-PGR yra efektyvūs ir tinkami identifikacijoje abiejų dirvožemiu plintančių virusų. Šiais metodais buvo nustatyta, kad iš tiesų šie virusai yra plačiai paplitę kultūriniuose augaluose.

PMTV ir TRV virusai – tai lazdelės pavidalo virusai. TRV buvo išgrynintas bei patvirtinta jo morfologija, naudojant elektroninės mikroskopijos metodą.

Siekiant įsitikinti PMTV patogeniškumu ir viruso tyrimo aktualumu, buvo atliktas eksperimentas, kuris įrodė, kaip greitai šis virusas plinta skirtinguose indikatoriniuose augaluose. Kai kuriuose augaluose jau praėjus 3 dienom po inokuliacijos buvo identifikuotas PMTV. Manoma, kad panašus plitimas turėtų būti ir natūraliame šio viruso šeimininke *Solanum tuberosum* L.

Kovoti su augalų virusais yra labai sudėtinga, todėl vienas iš galimų kovos būdų su šiais patogenais – tai kova su jų platintojais (vektoriais). Todėl šiame darbe buvo siekiama, kuo daugiau išsiaiškinti apie PMTV vektorių – grybą *Spongospora subterranea*. Buvo nustatytas šio vektoriaus produktyvumas, infektyvumas ir išgyvenamumas.

SUMMARY

Potato mop-top virus (genus *Pomovirus*) and *Tobacco rattle virus* (genus *Tobravirus*) – soil born viruses. These pathogens are distributed worldwide and can significantly reduce the quality and yield of potato and other horticultural plants. So in recent years more and more people are interesting in these viruses. These viruses are responsible for economic losses in potato crops. To control the spread of viruses is vary difficult, so nowadays it is a serious problem, which everybody wants to solve it. Virus control depends on vector management, so the main purpose of this article was to know more about these viruses and thier vectors and to do first steps to finding ways of viruses' suitable control measures.

PMTV has narrow range of hosts. On the contrary TRV has a very wide natural host range. So it is one of the differences from these soil borne viruses.

However diagnosis is further complicated by the fact that TRV and PMTV are very similar viruses, even they can cause similar symptoms to indicator plants. So to diagnose reliable these viruses by visual symptoms are very difficult. Just in indicator plant *N. benthamiana* these soil borne viruses cause different symptoms: PMTV cause sistematical reaction, sistematical mosaic spreads in whole plant and TRV cause local lessions.

PMTV and TRV were identificados with different molecular methods. These viruses were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. DAS-ELISA was shown to be more sensitive and reliable method for PMTV than TRV. Other molecular methods such as RT-PGR, IC-RT-PGR are effective and sensitive for identification of both soil born viruses.

PMTV and TRV are rod-shaped viruses. TRV was purified. Purification and electron microscopy – these two methods helped to see the morphology of TRV.

There was made an experiment which show how quickly PMTV spread in different indicator plants. It was seen the pathogenesis and infectivity of this soil born virus. In 3 days after inoculation PMTV was identified by ELISA method in some indicator plants. It seems that very similar spread must be and in the natural PMTV host – *Solanum tuberosum* L.

To control plant viruses are very difficult, practically impossible. First of all you must to control the vector of virus. So in this scientific work it was trying to know more about the vector of PMTV - the fungus *Spongospora subterranea*. It was established the productivity, infectivity of this vector.

PADĖKA

Norėčiau padėkoti savo vadovams habil. dr. Juozui Staniuliui už patarimus ir pagalbą, rašant šį baigiamąjį darbą, už galimybes atlikti darbą Botanikos Institute. Dr. Steen Lykke Nielsen noriu padėkoti už originalias idėjas, patarimus bei diskusijas, už galimybę atlikti dalį eksperimentų, padirbėti su įvairiausiai metodais, taipogi už galimybę padirbėti Aarhus Universitete Žemės ūkio mokslų fakultete Augalų apsaugos departamente Danijoje (Aarhus University, Faculty of Agricultural Science, Department of Plant Pathology). Visam Danijoje darbo kolektyvui noriu padėkoti už supratingumą, geranoriškumą bei pagalbą.

Botanikos Instituto Fitovirusų laboratorijos darbuotojams: dr. I. Zitikaitei norėčiau padėkoti už patarimus, pamokymus, palaikymą, bei pagalbą ruošiant šį magistrinį darbą, vyr. m. d. M. Samuitienei ir habil. dr. M. Navalinskienei norėčiau padėkoti už virusinio izoliato gavimą, doktorantei M. Žižytei už pagalbą ruošiant ir pristatant magistrinį darbą.

LITERATŪRO SĄRAŠAS

1. Andersen B. A. B., Nicolaisen M., Nielsen S. L. 2002. Alternative hosts for *Potato mop top virus*, genus Pomovirus and its vector *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. *Potato research* **45**: 37 – 43.
2. Arif M., Torrance L., Reavy B. 1995. Acquisition and transmission of *Potato mop - top furovirus* by a culture of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* derived from a single cystosorus. *Ann. Appl. Biol.* **126**: 493 – 503.
3. Arif M., Torrance L., Reavy B. 1994. Improvement efficiency of detection of potato mop-top furovirus in potato tubers and in the roots and leaves of soil-bait plants. *Potato Research* **37**: 373 – 381.
4. Barker H., Reavy B., McGeachy D., Dawson S. 1998. Transformation of *Nicotiana benthamiana* with the *Potato mop-top* virus coat protein gene produces a novel resistance phenotype mediated by the coat protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11(7)**: 626 – 633.
5. Bergh S. T., Koziel G. M., Huang S. C., Thomas A. R. Gilley P. D. 1985. The nucleotide sequence of *Tobacco rattle virus* RNA – 2 (CAM strain). *Nucleic Acids Research* **13(23)**: 8507 – 8518.
6. Brunt A. A. 1989. Viruses and virus-like pathogens transmitted by zoosporic fungi. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **19**: 437 – 451.
7. Brunt A. A., Richardst K. E. 1989. Biology and molecular biology of furoviruses. *Advances in Virus Research* **36**: 1 – 32.
8. Calvert E. L. 1966. *Potato mop – top*, a soil – borne virus. *Plant Pathology* **15**: 134 – 139.
9. Clark, M. F., Adams N. A. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme – linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**: 475 – 483.
10. Cooper J. I., Asher M. J. C., 1988. Viruses with fungal vectors. The Association of Applied Biologists.
11. Cornelissen Ben J.C., Linthorst Huub J.M., Brederode Frans Th, Bol John F. 1986. Analysis of the genome structure of *Tobacco rattle virus* strain PSG. *Nucleic Acids Research* **14(5)**: 2157-2169.
12. Crosslin J. M., Thomas P. E., Hammond R. W. 2003. genetic variability of genomic RNA – 2 of four *Tobacco rattle tobnavirus* isolates from potato fields in the Northwestern United States. *Virus Research* **96**: 99 – 105.

13. Dale M. F. B., Robinson D. J., Todd D. 2004. Effects of systemic infections with *Tobacco rattle virus* on agronomic and quality traits of a range of potato cultivars. *Plant Pathology* **53**: 788 – 793.
14. Dale M. F. M., Robinson J. R., Griffiths W. D. , Todd D., Bain H. 2000. Effects of tuber – borne M – type strain of *Tobacco rattle virus* on yield and quality attributes of potato tubers of the cultivar Wilja. *European Journal of Plant Pathology* **106**: 275 – 282.
15. Faugnet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L. A. 2005. Virus taxonomy. Elsevier Academic press.
16. Foxe M. J. 1979. An investigation of the distribution of *Potato mop-top virus* in County Donegal. *Journal of Life Sciences, Royal dublin Society* **1**: 149 – 155.
17. Frankel – Conrat H. and Singer B. 1957. Virus reconstitution. II. Combination of protein and nucleic acid from different strains – *Biochemica et Biophysica . Acta Hort* **24**: 540 – 548.
18. Germundsson A., Sandgren Jr. M., Barker H., Savenkov E. I., Valkonen P. T. 2002. Initial infection of roots and leaves reveals different resistance phenotypes associated with coat protein gene-mediated resistance to *Potato mop-top virus*. *Journal of General Virology* **83**: 1201 – 1209.
19. Graaf P., Lees A. K., Wale S. J., Duncan J. M. 2005. Effect of soil inoculum level and environmental factors on potato powdery scab caused by *Spongospora subterranea*. *Plant Pathology* **54**: 22 – 28.
20. Harrison B. D., Jones R. A. C. 1970. Host range and some properties of *Potato mop top virus*. *Ann.Appl. Biol.* **65**: 393 – 402.
21. Harrison J. G., Searle R. J., Williams N. A. 1997. Powdery scab disease of potato – a review. *Plant Pathology* **46**: 1 – 25.
22. Harrison, B.D., Robinson, D.J. 1978. The *tobraviruses*. *Adv. Virus Res.* **23**: 25 – 77.
23. Henze C., Barga van S., Sadwska-Rybak M., Willingmann P., Adam G. 2000. Sequences of *Tobacco rattle virus* from potato. *J. Phytopathology* **148**: 547 – 554.
24. Hernandez C., Carette E. J., Brown derek J. F., Bol F. J. 1996. Serial passage of *Tobacco rattle virus* under different selection conditions results in deletion of structural and nonstructural genes in RNA – 2. *Journal of Virology* **70(8)**: 4933 – 4940.
25. Kashiwazaki S., Scott P. K., Reavy B., Harrison D. B. 1995. Sequence analysis and gene content of *Potato mop-top virus* RNA-3: further evidence of heterogeneity in the genome organization of furovirus. *Virology* **206**: 701 – 706.
26. Kawchuk L. M., Lynch D. R., Leggett F. L., Howard R. J., McDonald J. G. 1996. Detection and characterization of a Canadian *Tobacco rattle virus* isolate using a PCR – based assay. *Canadian Journal of Plant Pathology* **19**: 101 – 105.

27. Kole A. P. 1954. A contribution to the knowledge of *Spongospora subterranea*, the cause of powdery scab of potatoes. *Tijdschrift over Plantenziekten* **60**: 1 – 65.
28. Kole A. P., Gielink A. J. 1963. The significance of the zoosporangial stage in the life cycle of the plasmodiophorales. *Netherland Journal of Plant Pathology* **69**: 258 – 262.
29. Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680 – 685.
30. Liu Y., Schiff M., Marathe R. Dinesh – Kumar S. P. 2002. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N – mediated resistance to *Tobacco mosaic virus*. *The Plant Journal* **30(4)**: 415 – 429.
31. Lui H., Reavy B., Swanson M., MacFarlane S. A. 2002. Functional replacement of *Tobacco rattle virus* Cystein rich protein by pathogenicity protein from unrelated plant virus. *Virology* **298**: 232 – 239.
32. Lukhovitskaya N. I., Yelina N. E., Zamyatnin Jr. A. A., Schepetilnikov M.V., Solovyev A. G., Sandgren M., Morozov S. Yu., Valkonen J. P. T., Savenkov E. I. 2005. Expression, localization and effects on virulence of the cysteine-rich 8 kDa protein of *Potato mop-top virus*. *Journal of General Virology* **86**: 2879 – 2889.
33. MacFarlane Stiuart A. 1999. Molecular biology of the *tobravirus*. *Journal of General Virology* **80**: 2799 – 2807.
34. MacFarlane Stiuart A. 2003. Molecular determinants of the transmission of plant viruses by nematodes. *Molecular Plant Pathology* **4(3)**: 211 – 215.
35. MacFarlane Stiuart A., Vassilakos N., Brown Derek J. F. 1999. Similarities in the genome organization of *Tobacco rattle virus* and *Pea – early browning virus* isolates that are transmitted by the some vector nematode. *Journal of General Virology* **80**: 273 – 276.
36. Makarainen E., Rita H., Teperi E., Valkonen J. P. T. 1994. Resistance to *Spongospora subterranea* in tuber-bearing and non tuber-bearing *Solanum* spp. *Potato Research* **37**: 123 – 127.
37. Merz U. 1989. Infectivity, inoculum density and germination of *Spongospora subterranea* resting spores: a solution – culture test system. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **19**: 585 – 592.
38. Matthews R. E. F. 1991. Plant Virology. Academic press, inc.
39. Mills P. R. 1987. Comparison of cDNA hybridisation and other tests for the detection of *Potato mop-top virus*. *Potato Research* **30**: 437 – 451.
40. Molgaard J. P., Nielsen S. L. 1996. Influence of post harvest temperature treatments, storage period and harvest date on development of spraing caused by *Tobacco rattle virus* and *Potato mop – top virus*. *Potato Research* **39**: 571 – 579.

41. Nicolaisen M., Bosze Z., Nielsen S. L. 1999. Detection of *Tobacco rattle virus* in potato tubers using a simple RT-PCR procedure. *Potato Research* **42**: 173 – 179.
42. Nielsen S. L., Larsen J. 2004. Two *Trichoderma harzianum* – based bio – control agents reduce tomato root infection with *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh., f. sp. *subterranea*, the vector of *Potato mop – top virus*. *Journal of Plant Diseases and Protection* **111(2)**: 145 – 150.
43. Nielsen S. L., Molgaard J. P. 1997. Incidence, appearance and development of *Potato mop – top furovirus* – induced spraing in potato cultivars and the influence on yield, distribution in Denmark and detection of the virus in tubers by ELISA. *Potato Research* **40**: 101 – 110.
44. Nielsen S. L., Nicolaisen M. 2003. Identification of two nucleotide sequence sub-groups within *Potato mop-top virus*. *Arch. Virol* **148**: 381 – 388.
45. Pečenkova T., Moravec T., Filigarova M., Rosecka P., Cerovska N. 2004. Extended sequence analysis of three danish *Potato mop top virus* (PMTV) isolates. *Virus Genes* **29**: 149 – 255.
46. Reavy B., Arif m., Cowan G. H., Torrance L. 1998. Association of sequences in the coat protein/readthrough domain of *Potato mop – top virus* with transmission by *Spongospora subterranea*. *Journal of General Virology* **79**: 2343 – 2347.
47. Robinson D. J. 1992. detection of *Tobacco rattle virus* by reverse transcription and polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* **40**: 57 – 66.
48. Robinson D. J. 2004. Identification and nucleotide sequence of a *Tobacco rattle virus* RNA – 1 variant that causes spraing disease in potato cv. Binje. *J. Phytopathology* **152**: 286 – 290.
49. Sandgren M. 1995. *Potato mop-top virus* (PMTV): Distribution in Sweden, development of symptoms during storage and cultivar trials in field and glasshouse. *Potato Reseach* **38(4)**: 379 – 389.
50. Sangren M., Savenkov E. I., Valkonen J. P. T. 2001. The readthrough region of *Potato mop top virus* (PMTV) coat protein encoding RNA, the second largest RNA of PMTV genome, undergoes structural changes in naturally infected and experimentally inoculated plants. *Arch Virol* **146**: 467 – 477.
51. Savenkov E. I., Germundsson A., Zamyatnin A. A., Sandgren Jr. M., Valkonen P. T. 2003. *Potato mop-top virus*: the copat protein-encoding RNA and the gene for cysteine-rich protein are dispensable for systemic virus movement in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of General Virology* **84**:1001 – 1005.

52. Savenkov E. I., Sandgren M., Valkonen P. T. 1999. Complete sequence of RNA 1 and the presence of tRNA – like structures in all RNAs of *Potato mop top virus*, genus *Pomovirus*. *Journal of General Virology* **80**: 2779 – 2784.
53. Sokmen M. A., Barker H., Torrance L. 1998. Factors affecting the detection of *Potato mop-top virus* in potato tubers and improvement of testprocedures for more reliable assays. *Ann. Appl. Biol.* **133**: 55 – 63.
54. Sudarshana M. R., Berger P. H. 1998. Nucleotide sequence of both genomic RNAs of a North American *Tobacco rattle virus* isolate. *Archives of Virology* **143**: 1535 – 1544.
55. Taylor S. C. 1998. *Tobravirus* isolation and RNA extraction. In: G. D. Foster, S. C. Taylor (eds). *Methods in molecular biology. Plant virology protocols from virus isolation to transgenic resistance*. Humana press. Totowa, New Jersey **81**: 115 – 121.
56. Todd J. M. 1967. *Soil-borne virus* diseases of potato. *N. A. A. S.* **77**: 21 – 29.
57. Torrance L., Cowan G. H., Sokmen M. A., Reavy B. 1999. A naturally occurring deleted form of RNA 2 of *Potato mpo top virus*. *Journal of General Virology*: **80**: 2211 – 2215.
58. Uhde K., Koenig R., Lesemann D. – E. 1998. An onion isolate of *Tobacco rattle virus*: reactivity with an antiserum to *Hypochoeris mosaic virus*, a putative *furovirus*, and molecular analysis of its RNA - 2 . *Arch. Virol.* **143**: 1041 – 1055.
59. Vassilakos N., Vellios E. K., Brown E. C., Brown D. J. F., MacFarlane S. A. 2001. *Tobravirus* 2b protein acts in trans to facilitate transmission by nematodes. *Virology* **279**: 478 – 487.
60. Verchot-Lubica J. 2003. Soilborn viruses: advances in virus movement, virus induced gene silencing, and engineered resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **62**: 55 – 63.
61. Visser B. P., Bol J. F. 1999. Nonstructural proteins of *Tobacco rattle virus* which have a role in nematode – transmission: expression pattern and interaction with viral coat protein. *Journal of General Virology* **80**: 3273 – 3280.
62. Weidemann H. L. 1995. Detection of *Tobacco Rattle Virus* in potato tubers and roots by polymerase chain reaction (PCR). *J. Phytopathology* **143**: 455 – 458.
63. Xinshun Qu., Barbara J. C. 2006. Single cystosorus isolate production and restriction fragment length polymorphism characterization of the obligate biotroph *Spongospora subterranea f. sp. subteranea*. *Phytopathology* **96**: 1157 – 1163.
64. Zaitlin, M., Hull R. 1987. Plant-virus-host interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **38**: 291 – 315.