

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS TYRIMŲ CENTRO BOTANIKOS INSTITUTAS

Genovaitė Marija Žižytė

RUNKELIŲ RIZOMANIJĄ SUKELIANČIO VIRUSO IDENTIFIKACIJA IR
MOLEKULINĖ CHARAKTERISTIKA

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, biologija (01 B),
mikrobiologija, bakteriologija, virusologija, mikologija (B 230)

Vilnius, 2010

Disertacija rengta 2005 – 2009 metais Botanikos institute

Mokslinis vadovas:

Habil. dr. Juozas Benediktas Staniulis (GTC Botanikos institutas, biomedicininiai mokslai, biologija – 01B, mikrobiologija, bakteriologija, virusologija, mikologija – B 230)

Konsultantas:

Prof. Jari Valkonen (Helsinkio universitetas, Žemės ūkio mokslo departamentas, Suomija)

Turinys

Santrumpų sąrašas.....	5
Įvadas.....	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	12
1.1. Rizomanija, jos atradimas.....	12
1.2. Rizomanijos pernešėjas <i>Polymyxa betae</i> Keskin.....	14
1.2.1. Pernešėjo taksonomija.....	15
1.2.2. <i>P. betae</i> gyvenimo ciklas ir šeimininkų spektras.....	16
1.2.3. Virusų-pernešėjo sąveika.....	20
1.3. Runkelių nekrotinio gyslių pageltimo virusas – BNYVV.....	22
1.3.1. Virusų taksonomija.....	24
1.3.2. BNYVV genomo struktūra ir savybės.....	25
1.3.3. BNYVV kintamumas, pagrindiniai tipai.....	29
1.4. Virusų ir šeimininko sąveika.....	31
1.4.1. Ligų paplitimą ir sunkumą įtakojantys faktoriai.....	31
1.4.2. Rizomanijos kontrolė.....	34
1.4.2.1. BNYVV atsparių cukrinių runkelių veislių paieška.....	35
1.4.2.2. Atsparumas virusų pernešėjui.....	38
1.4.2.3. Transgeninis atsparumas.....	39
1.4.3. Sąveika su kitais dirvožemiu plintančiais virusais	40
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	43
2.1. Medžiagos.....	43
2.1.1. Tiriamieji simptomatiniai augalai.....	43
2.1.2. Reagentai ir rinkiniai.....	44
2.1.3. Fermentai.....	46
2.1.4. Molekulinės masės standartai ir dažai.....	46
2.1.5. Oligonukleotidiniai pradmenys.....	46
2.1.6. Buferiai ir tirpalai.....	47
2.2. Metodai.....	50
2.2.1. Augalinės infekuotos medžiagos sukaupimas, augalų indikatorių metodas.....	50
2.2.2. BNYVV gryninimas ir koncentravimas.....	50
2.2.3. Elektroninė mikroskopija (EM).....	52
2.2.3.1. Imunosorbentinė elektroninė mikroskopija (IEM).....	53
2.2.4. BNYVV polikloninių antikūnų paruošimas.....	53
2.2.4.1. Antiserumo gavimas.....	53
2.2.4.2. Antikūnų konjugavimas su krienų peroksidaze.....	54
2.2.5. Imunofermentinė analizė (IFA).....	55
2.2.5.1. Netiesioginė IFA. Polikloninių antikūnų titras.....	55
2.2.5.2. Tiesioginė IFA. Konjugatų su peroksidaze titras.....	55
2.2.5.3. Tiesioginė dvisluoksnio antikūnų sumuštinio IFA.....	56
2.2.5.4. Tiesioginė trisluoksnio antikūnų sumuštinio IFA.....	56
2.2.6. Rizomanijos diagnostinis ekspres testas.....	57
2.2.7. Totalinės RNR išskyrimas.....	58
2.2.8. BNYVV analizė PCR metodais.....	58
2.2.8.1. Atvirkštinės transkripcijos polimerazinė ciklinė reakcija.....	60
2.2.8.2. Lizdinė PCR (nPCR).....	62
2.2.8.3. Serologiškai imobilizuoto viruso AT-PCR.....	62
2.2.9. BNYVV tipų nustatymas.....	63

2.2.9.1. Restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo analizė.....	63
2.2.9.2. BNYVV tipų nustatymas daugybine AT-PCR.....	63
2.2.10. DNR elektroforezė.....	64
2.2.10.1. DNR elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje.....	64
2.2.10.2. DNR elektroforezė agarozės gelyje.....	64
2.2.11. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio.....	64
2.2.12. Nukleotidinių sekų kompiuterinė analizė.....	65
2.2.13. Baltymų NDS poliakrilamidinio gelio elektroforezė.....	65
2.2.13.1. Poliakrilamidinio gelio dažymas.....	66
2.2.14. Imunoblotas.....	66
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	68
3.1. Rizomanijos simptomai, paplitimas ir identifikacija DAS-IFA metodu.....	68
3.2. Augalų indikatorių panaudojimas BNYVV identifikacijai ir viruso padauginimui.....	72
3.3. Rizomanijos sukėlėjo morfologijos nustatymas.....	74
3.4. BNYVV identifikacija molekuliniais metodais.....	75
3.4.1. BNYVV tipų nustatymas.....	77
3.4.2. BNYVV izoliatų apvalkalo baltymo geno analizė.....	80
3.4.3. BNYVV RNR 3 koduojamo P25 baltymo filogenetinė analizė.....	88
3.5. Kitų runkelius pažeidžiančių virusų, susijusių su rizomanija, aptikimas	95
3.6. BNYVV imunodiagnostinės sistemos sukūrimas.....	97
3.6.1. BNYVV gryninimas ir koncentravimas.....	97
3.6.2. Virusų apvalkalo baltymo analizė.....	99
3.6.3. Polikloninių antikūnų gavimas.....	100
3.6.4. Serologinė polikloninių antikūnų analizė.....	101
3.7. Rezultatų apibendrinimas.....	103
IŠVADOS.....	107
Literatūros sąrašas.....	108
Publikacijų sąrašas.....	124
Padėka.....	125

Santrumpų sąrašas

ag	antigenai
ak	antikūnai
APS	amonio persulfatas
AT-PCR	atvirkštinės transkripcijos polimerazinė ciklinė reakcija
BaMMV	miežių silpnosios mozaikos virusas (<i>Barley mild mosaic virus</i>)
BBSV	runkelių juodosios degligės virusas (<i>Beet black scorch virus</i>)
BCIP/NBT	bromochloroindolilfosfatas/nitromeliotetrazolis
BYV	runkelių geltos virusas (<i>Beet yellows virus</i>)
BMYV	runkelių silpnojo pageltimo virusas (<i>Beet mild yellowing virus</i>)
BNYVV	runkelių nekrotinio gyslų pageltimo virusas (<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>)
BOLV	runkelių ažuolo-lapo virusas (<i>Beet oak-leaf virus</i>)
BSA	jaučio serumo albuminas (<i>angl. bovine serum albumin</i>)
BSBMV	runkelių dirva pernešamas mozaikos virusas (<i>Beet soil-borne mosaic virus</i>)
BSBV	runkelių dirva pernešamas virusas (<i>Beet soil-borne virus</i>)
BVQ	runkelių virusas Q (<i>Beet virus Q</i>)
CP	apvalkalo baltymas (<i>angl. coat protein</i>)
DAS-IFA	dvisluoksnio antikūnų sumuštinio imunofermentinė analizė (<i>angl. DAS-ELISA, double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay</i>)
DEPC	dietilpirokarbonatas
DIECA	natrio dietilditiokarbamatas
dvRNR	dvivijė RNR
EDTA	etilendiamintetraacetatas
EM	elektroninė mikroskopija
F	fenilalaninas
HRP	krienių peroksidazė (<i>angl. horseradish peroxidase</i>)
I	izoleucinas
IC-RT-PCR	serologiškai imobilizuoto viruso AT-PCR (<i>angl. immunocapture RT-PCR</i>)
ICTV	tarptautinis virusų taksonomijos komitetas (<i>angl. International Committee on Taxonomy of Viruses</i>)
IEM	imunosorbentinė elektroninė mikroskopija
IFA	imunofermentinė analizė
Ig	imunoglobulinai
K	lizinas
K-	neigiama kontrolė
K+	teigiama kontrolė
kb	kilobazė
kDa	kilodaltonas
kDNR	kopijinė DNR
Kv	vandens kontrolė
L	leucinas
m-ak	monokloniniai antikūnai
ME	merkaptio etanolis
mRT-PCR	daugybė AT-PCR (<i>angl. multiplex RT-PCR</i>)
N	asparaginas

NDS-PAGE	natrio dodecilsulfato-poliakrilamidinė gelio elektroforezė
nPCR	lizdinė PCR (<i>angl.</i> nested PCR)
OEPP/EPPO	Europos ir Viduržemio Tarptautinės augalų apsaugos organizacija (<i>angl.</i> European and Mediterranean Plant Protection Organization)
ORF	atviras skaitymo rėmelis (<i>angl.</i> open reading frame)
p-ak	polikloniniai antikūnai
PBS	fosfatinis buferinis tirpalas
PBS-T	fosfatinis buferinis tirpalas su 0,1% Tween-20
PCR	polimerazinė ciklinė reakcija (<i>angl.</i> polymerase chain reaction)
PEG	polietilenglikolis
PLRV	bulvių lapų susisukimo virusas (<i>Potato leafroll virus</i>)
PVY	bulvių virusas Y (<i>Potato virus Y</i>)
PVP	polivinilpirolidonas
R	argininas
RaM-ap	antriniai triušio ak, gauti iš pelės ir konjuguoti su šarmine fosfotaze (<i>angl.</i> rabbit anti-mouse IgG-alkaline phosphatase conjugate)
rDNR	ribosominę RNR koduojanti DNR
RdRp	nuo RNR priklausoma RNR polimerazė (<i>angl.</i> RNA-dependent RNA polymerase)
RFLP	restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo analizė (<i>angl.</i> restriction fragment length polymorphism)
rpm	apsisukimų skaičius per minutę (<i>angl.</i> revolutions per minute)
S	serinas
scFv	antikūnų trumposios grandinės fragmentas (<i>angl.</i> single-chain variable fragment)
SSCP	vienvijės konformacijos polimorfizmo analizė (<i>angl.</i> single strand conformation polymorphism)
T	treoninas
TAS-IFA	trisluoksnių antikūnų sumuštinio imunofermentinė analizė (<i>angl.</i> TAS-ELISA, triple antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay)
TEMED	N,N,N',N' – tetrametilendiaminas
TGB	trigubas genų blokas (<i>angl.</i> triple gene block)
TMB	3,3',5,5' tetrametilbenzidinas
TNV	tabako nekrozės virusas (<i>Tobacco necrosis virus</i>)
TRIS	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis
UA	uranilacetatas
V	valinas
vvRNR	vienvijė RNR

ĮVADAS

Pasaulyje žinoma apie 50 cukrinius runkelius infekuojančių ligų, iš kurių apie 20 yra ekonomiškai labai svarbios (Mukhopadhyay, 1987). Cukrinius runkelius (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* convar. *vulgaris* var. *altissima* Döll) Europoje pažeidžia keletas skirtingų virusinių ligų. Geltligių virusų, priklausančių *Luteoviridae* ir *Closteroviridae* šeimoms, sukeliama pažeidimai dažniau pasireiškia lapuose įvairaus intensyvumo chlorozėmis. Šiuos virusus platina amarai (Stevens ir kt., 2005b). Dirvožemyje gyvenantys grybai platina apie 30 augalų virusų rūšių (Campbell, 1996). Iš jų cukrinių runkelių derliui didžiausią žalą daro *Polymyxa betae* Keskin platinamas šaknų rizomanijos sukėlėjas (Tamada ir Baba, 1973). Rizomanija yra dirvožemiui plintanti liga, aptinkama pagrindiniuose pasaulio cukrinių runkelių auginimo regionuose, nulemianti didelius derliaus nuostolius (50-60 %) (Henry, 1996). Veiksmingų prieš šią ligą kontrolės priemonių nėra. Ją sukelia runkelių nekrotinio gyslų pageltimo virusas (*Beet necrotic yellow vein virus*, BNYVV), turintis daugiakomponentį RNR genomą. Visų natūralių BNYVV izoliatų sudėtyje yra keturios RNR rūšys, tačiau kai kurie izoliatai turi penktą RNR (Tamada ir kt., 1989). RNR 1 ir RNR 2 yra viruso „namų genai“, reikalingi infekcijai, o mažesnės RNR yra susijusios su patogeniškumu ir viruso perdavimu (Richards ir Tamada, 1992).

BNYVV yra trijų pagrindinių (A, B ir P) tipų, kurie serologiškai nesiskiria. A tipas yra aptiktas Europos šalyse, Irane, Š. Amerikoje, Kinijoje ir Japonijoje, o B tipas – Prancūzijoje, Vokietijoje ir kai kuriose Švedijos, Kinijos ir Japonijos vietovėse (Saito ir kt., 1996; Miyanishi ir kt., 1999; Lennefors ir kt., 2000; Sohi ir Maleki, 2004). BNYVV A ir B tipų nukleotidinių sekų skirtumas yra nedidelis, nukleotidų identiškumas svyruoja 96-99 % intervale (Saito ir kt., 1996; Koenig ir Lennefors, 2000). Nors buvo manoma, kad šių dviejų tipų patogeniškumas nesiskiria, visgi buvo parodyta, kad BNYVV A tipas cukriniams runkeliams yra šiek tiek daugiau patogeniškas nei B tipas (Heijbroek ir kt., 1999; Rush ir kt., 2006).

RNR 5 komponentą turintys BNYVV izoliatai, rasti Azijoje ir kai kuriose Europos dalyse, buvo pavadinti P tipo izoliatais (Koenig ir kt., 1997; Koenig ir Lennefors, 2000). Tokie RNR 5 komponentą turintys izoliatai taip pat buvo rasti Jungtinėje Karalystėje, Kinijoje ir Japonijoje (Tamada ir kt., 1996; Koenig ir Lennefors, 2000; Harju ir kt., 2002). Šie izoliatai pasižymi didesniu agresyvumu ir patogeniškumu nei kiti BNYVV izoliatai (Tamada ir kt., 1996; Miyanishi ir kt., 1999). P tipo BNYVV augaluose juda daug greičiau nei A arba B tipo virusai, o iš dalies atspariose veislėse stebima daug ryškesnė šaknų infekcija, palyginus su analogiškais augalais, užkrėstais A arba B tipo virusais (Heijbroek ir kt., 1999). BNYVV P tipas gali išvengti augalų apsaugos atsakų aktyvinimo, todėl jis gali būti žalingas cukriniams runkeliams tose pasaulio šalyse, kuriose rizomanijos kontrolė grindžiama virusui atsparių runkelių veislių naudojimu (Klein ir kt., 2007).

Rizomanijos tyrimai ir molekulinė BNYVV izoliatų analizė gali padėti nustatyti koreliaciją tarp molekulinų BNYVV savybių ir geografinės kilmės. Virusų geno sekų analizė gali padėti charakterizuoti izoliatų įvairovę, nustatyti viruso tipus bei nustatyti pokyčius genų koduojamose baltymų sekose, sąlygojančiose BNYVV patogeniškumą.

Polikloninių antikūnų panaudojimas imunofermentinės analizės metuose gali būti pritaikytas rutininiam šio viruso aptikimui. Tai leistų atrinkti viruso izoliatų biologinių ir morfologinių savybių nustatymui bei molekulinei charakteristikai.

Šio darbo tikslas yra charakterizuoti runkelių rizomaniją Lietuvoje sukeltą virusą biologiniais, imunofermentiniais, elektroninės mikroskopijos ir molekuliniais metodais; nustatyti kokiam molekuliniam tipui priklauso Lietuvoje izoliuoti rizomanijos sukėlėjai bei įvertinti jų ir kitų šalių BNYVV izoliatų baltymų sekų filogenetinius ryšius; gauti iš triušio polikloninius antikūnus prieš BNYVV ir ištirti jų panaudojimo galimybes šio viruso diagnostikai.

Darbo uždaviniai:

1. Identifikuoti rizomaniją sukeliančią runkelių nekrotinio gyslų pageltimo virusą (BNYVV) cukrinių runkelių pasėliuose Lietuvoje naudojant imunofermentinės analizės ir skirtingus PCR metodus. Nustatyti efektyviausią ir jautriausią PCR metodą, tinkamą BNYVV identifikacijai.
2. Pernešti BNYVV į augalus indikatorius, padauginti ir gauti gryną viruso preparatą, nustatyti bei palyginti infekcijos šaltiniuose ir augaluose indikatoriuose aptinkamų virionų morfologines, serologines savybes.
3. Nustatyti išskirtų BNYVV izoliatų tipus.
4. Palyginti skirtingose geografinėse vietovėse aptiktų šio viruso izoliatų apvalkalo ir P25 baltymų genų fragmentų sekas.
5. Pagaminti polikloninius antikūnus prieš BNYVV.
6. Paruošti BNYVV antikūnų konjugatą su krienų peroksidaze ir įvertinti gautų preparatų tinkamumą šio viruso diagnostikai.

Mokslinis naujumas

- ✓ Pirmą kartą panaudojant molekulinės biologijos metodus charakterizuotas runkelių rizomaniją sukeliantis runkelių nekrotinio gyslų pageltimo virusas Lietuvos cukrinių runkelių pasėliuose.
- ✓ Identifikuoti du skirtingi (A ir B) Lietuvoje išskirtų BNYVV izoliatų tipai. Nustatyta, kad Ukrainoje išskirti BNYVV izoliatai priklauso A tipui, o Kazachstane – P tipui.
- ✓ Įvertintos šio viruso izoliatų morfologinės ir serologinės savybės.
- ✓ Išgrynintas antikūnams gaminti tinkamas viruso preparatas. Sukurta imunofermentinė sistema tinkanti BNYVV diagnozuoti.

Taigi, šis darbas prisidėjo prie BNYVV izoliatų įvairovės ir kintamumo tyrimo.

Ginamieji teiginiai

1. Lietuvoje, Ukrainoje ir Kazachstane aptiktuose cukrinių runkelių mėginiuose, rodančiuose rizomanijos simptomus, imunofermentinės analizės ir molekuliniais metodais identifikuotas runkelių nekrotinio gyslų pageltimo virusas (BNYVV).
2. Rizomanija infekuotuose augalų mėginiuose ir išgrynintuose viruso preparatuose aptiktų virionų morfologinės savybės yra būdingos BNYVV.
3. Lietuvoje išskirti ir išanalizuoti BNYVV izoliatai yra dviejų skirtingų tipų: Pn – A tipo, o St ir T – B tipo. Nustatyta, kad visi Ukrainoje gauti BNYVV izoliatai priklauso A tipui, o izoliatas iš Kazachstano – P tipui.
4. Lietuvoje išskirtų BNYVV izoliatų P25 baltymo sekos turi skirtingas aminorūgščių tetradas (67–70 padėtyje). Parodyta koreliacija tarp viruso izoliatų apvalkalo ir P25 baltymų: Lietuvoje išskirti St ir T izoliatai priklauso B tipo viruso izoliatams, turintiems pastovią AYHR tetradą, Pn – A tipo viruso izoliatams, turintiems kintamą tetradą.
5. Gautas išgrynintas BNYVV preparatas yra tinkamas polikloninių antikūnų gavimui.
6. Sukurta imunofermentinė sistema, sudaryta iš gautų polikloninių antikūnų prieš BNYVV bei šių polikloninių antikūnų ir krienų peroksidazės konjugato, tinka BNYVV diagnostikai IFA ir imunobloto metodais.

Darbo aprobavimas ir publikacijos

Disertacijos medžiaga buvo pristatyta 5 tarptautinėse ir 2 konferencijose Lietuvoje. Tyrimų rezultatai paskelbti 4 moksliniuose straipsniuose bei 7 konferencijų tezėse.

Disertacijos struktūra.

Disertacijos rankraštį sudaro: Įvadas, Literatūros apžvalga, Medžiagos ir metodai, Rezultatai ir jų aptarimas, Išvados, 204 literatūros šaltinių sąrašas, mokslinių publikacijų sąrašas. Disertacijos apimtis – 125 puslapiai, 14 lentelių ir 26 paveikslai. Disertacija parašyta lietuvių kalba, santrauka – anglų kalba.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Rizomanija, jos atradimas

Rizomanija (*angl.* Rhizomania) yra viena iš svarbiausių cukrinių runkelių (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* convar. *vulgaris* var. *altissima* Döll) virusinių ligų, nulemianti didelę ekonominę žalą. Ją sukelia runkelių nekrotinio gyslų pageltimo virusas (*Beet necrotic yellow vein virus*, BNYVV), kuris tarptautinio virusų taksonomijos komiteto (*angl.* International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 1997 m. buvo priskirtas *Benyvirus* genčiai (Tamada ir Baba, 1973). BNYVV yra pernešamas dirvožemio biotrofiniu parazitu *Polymyxa betae* Keskin, kuris išgyvena užkrėstame dirvožemyje daugelį metų (Keskin, 1964; Campbell, 1996; Adams ir kt., 2001; Rush, 2003).

Cukrinių runkelių rizomanija pirmą kartą buvo aptikta Šiaurės Italijoje Po lygumoje ir Adige slėnyje (Canova, 1959). Ligos pažeistų cukrinių runkelių derlius buvo labai menkas, o runkeliai turėjo nenormaliai daug pajuodusių nekrozinų šaknų. Tokius susidariusius simptomus A. Canova pavadino „rizomanija“ arba „šaknų beprotybe“ (*angl.* root madness) (Canova, 1966). Dirvožemyje gyvenantis *P. betae* buvo siejamas su šia liga, bet tikrasis ligos sukėlėjas nebuvo identifikuotas iki 1970 metų. Japonijoje keliuose Hokkaido rajonuose 1969 ir 1970 metais buvo staigus cukrinių runkelių ligos proveržis. K. Kanzawa pastebėjo, kad liga yra panaši į rizomaniją, atrastą Italijoje, ir pavadino ją japoniškai „Sokonbyo“ (Kanzawa ir Ui, 1972; Tamada, 2001). 1970 m. iš cukrinių runkelių buvo išskirtas lazdelės formos virusas, sukeliantis į rizomaniją panašią ligą. Remiantis augalų šeimininkų spektru, perdavimo būdu, fizinėmis savybėmis, viruso dalelės forma bei serologija buvo pasiūlyta šį virusą pavadinti BNYVV. Buvo nustatyta, kad jis ir yra rizomanijos sukėlėjas, o *P. betae* šio viruso pernešėjas (Tamada ir Baba, 1973).

Nuo ligos atradimo pradžios rizomanijos paplitimas buvo nustatytas visose didžiausiose cukrinius runkelius auginančiose šalyse (1.1. lentelė).

1.1. lentelė. Rizomanijos paplitimas pasaulyje (pagal McGrann ir kt., 2009).

Šalis	Rizomanijos aptikimo metai
Italija	1952
Japonija	1965
Kroatija	1971
Prancūzija	1971
Jugoslavijos federalinė respublika	1972
Graikija	1972
Vokietija	1974
Čekijos respublika	1978
Kinija	1978
Slovakija	1978
Austrija	1979
Kazachstanas	1979
Rumunija	1979
Rusija	1979
Ukraina	1979
JAV	1981
Vengrija	1982
Bulgarija	1983
Nyderlandai	1983
Šveicarija	1983
Belgija	1984
Jungtinė Karalystė	1987
Ispanija	1988
Švedija	1997
Sirija	1998
Danija	2000
Turkija	2001
Lenkija	2002
Egiptas	2003
Iranas	2004
Marokas	2005

Pagal paskelbtą Europos ir Viduržemio Tarptautinės augalų apsaugos organizacijos (*angl.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (OEPP/EPPO)) sąrašą BNYVV yra nustatytas daugelyje Europos (Austrija, Belgija, Bulgarija, Danija, Kroatija, Čekijos Respublika, Jugoslavijos federalinė respublika, Prancūzija, Vokietija, Graikija, Vengrija, Iranas, Kazachstanas, Kirgizija, Mongolija, Lenkija, Rumunija, Rusija, Ukraina, Slovakija, Slovėnija, Ispanija, Švedija, Šveicarija, Nyderlandai, Turkija ir Jungtinė karalystė) ir Azijos (Japonija, Kinija, Sirija) šalių, taip pat

Maroke ir Šiaurės Amerikoje (JAV valstijose) (1.1. lentelė) (Kanzawa ir Ui, 1972; Al Musa ir Mink, 1981; Gao ir kt., 1983; Duffus ir kt., 1984; Duffus ir Liu, 1987; Asher, 1993; Rush ir Heidel, 1995; Miyanishi ir kt., 1999; Lennefors ir kt., 2000; Nielsen ir kt., 2001; Mouhanna ir kt., 2002; Sohi ir Maleki, 2004; OEPP/EPPO, 2005; Yilmaz ir kt., 2007).

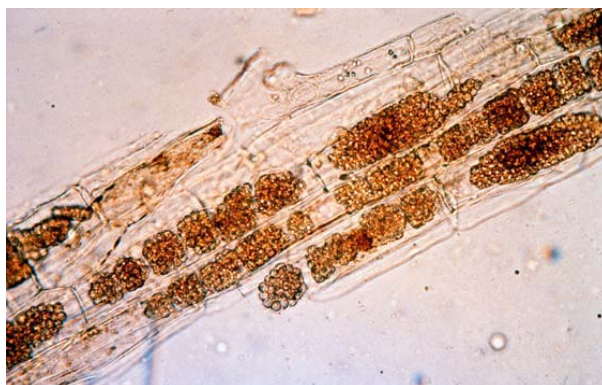
Rizomanija yra nustatoma vis naujose šalyse. Taigi, jos plitimas tęsiasi (Rush ir kt., 2003; Rush ir kt., 2006; McGrann ir kt., 2009). Ši liga lemia didžiulius ekonominius nuostolius cukrinių runkelių augintojams, nes sumažėja cukrinių runkelių derlius (50-60 %), pablogėja cukraus kokybė (Henry, 1996). Be to, rizomanija yra sunkiai kontroliuojama.

1.2. Rizomanijos pernešėjas *Polymyxa betae* Keskin

Dalis augalų virusų yra pernešami dirvožemyje gyvenančių *Plasmodiophorida* (*Polymyxa* spp. ir *Spongospora* spp.) ir *Chytridiales* (*Olpidium* spp.) eilės grybų. Nors dabar sistematiškai jie priskiriami protistams, tačiau fitopatologinėje literatūroje pagal tradiciją vis dar vadinami grybais. *Plasmodiophorida* ir *Chytridiales* yra zoosporinių dumblių ir sausumos augalų parazitai, plačiai paplitę pasaulyje. *Plasmodiophorida* eilės *Plasmodiophoridae* šeimai priklauso 35 rūšys, iš kurių 3 – *P. betae* Keskin, *P. graminis* Ledingham ir *Spongospora subterranea* (Wallroth) Lagerheim f. sp. *subterranea* Tomlinson yra augalų virusų pernešėjai. *Plasmodiophoridae* šeimos atstovų pernešami virusai turi teigiamai superspiralizuotą vienviję RNR (vvRNR), priklausantys penkioms (*Bymo-*, *Beny-*, *Furo-*, *Peclu-* ir *Pomovirus*) gentims. Šiuos virusus įgyja jų pernešėjai. Tokiu būdu virusai gali išlikti dirvožemyje daugelį metų (Cambell, 1996; Rush 2003; Verchot-Lubitz ir kt., 2007).

Rizomanijos sukėlėją perneša obligatinis parazitas *P. betae*, plintantis šaknimis. Tai yra išimtinai dirvožemiu plintanti liga (Fujisawa ir Sugimoto, 1977). BNYVV išgyvena savo pernešėjo *P. betae* viduje storomis sienelėmis padengtose ramybės būsenos sporose (1.1. pav.) (Campbell, 1996; Rush,

2003). Šių ramybės būsenos sporų sankaupos pajėgios išgyventi dirvožemyje daug metų ir praktiškai, jei jos jau kartą pateko į dirvožemį, jų pašalinti neįmanoma. Dėl šios priežasties, kai laukas yra infekuotas virulentiniu *P. betae*, prailginta pasėlių rotacija arba į rotaciją įvesti *P. betae* neimlūs augalai, nėra veiksmingos priemonės norint sumažinti ligos paplitimą. Nėra žinomos specifinės sąlygos, kurios galėtų iššaukti ramybės būsenos sporų sudygimą, tačiau laukuose esant imliems augalams – šeimininkams ir šlapiai šiltai (apie 25° C) dirvai šios sporos gali sudygti ir produkuoti virulentines pirmines zoosporas (Campbell, 1996).



1.1. pav. *P. betae* ramybės būsenos sporų sankaupos cukrinių runkelių šaknelėse (pagal OEPP/EPPO, 2004).

1.2.1. Pernešėjo taksonomija

Plasmodiophorida eilės *Plasmodiophoridae* šeimai priklausančio *P. betae* klasifikacija yra gana sudėtinga. Molekulinė *Plasmodiophorida* atstovų ribosomų mažųjų subvienetų ribosominės DNR (rDNR) sekų analizė parodė, kad jie nėra glaudžiai susiję nei su tikraisiais grybais, nei su kitais zoosporiniais augalų parazitais (Braselton, 1995; Kanyuka ir kt., 2003; Ward ir kt., 2004). Jie priskiriami protistams, labai skirtingai eukariotinių organizmų grupei ir, atrodo, labiausiai susiję su *Phagomyxida* (*Phagomyxa* sp.) ir *Maullinia ectocarpii* (gen. et sp. nov. (Plasmodiophorea)), diatominių ir siūlinių dumblių parazitais (Maier ir kt., 2000; Bulman ir kt., 2001). Taigi, *P.*

betae priklauso *Protozoa* karalystės *Cercozoa* skyriaus *Phytomyxea* klasės *Plasmodiophorida* eilės *Plasmodiophoridae* šeimai, kurioje, kai kurių autorių duomenimis, yra iki 17 genčių: *Anisomyxa*, *Ligniera*, *Maullinia*, *Membranosorus*, *Octomyxa*, *Plasmodiophora*, *Polymyxa*, *Pyrrhosorus*, *Rhizomyxa*, *Rozellopsis*, *Sorodiscus*, *Sorolpidium*, *Sorosphaera*, *Spongospora*, *Tetramyxa*, *Trematophlyctis*, *Woronina* (Braselton, 1995; Kanyuka ir kt., 2003; Cavalier-Smith ir Chao, 2003; Rochon ir kt., 2004).

Nepaisant taksonominio skirstymo, yra keletas bendrų *Plasmodiophoridae* savybių, patvirtinančių jų išskyrimą į atskirą taksonominę grupę. *Plasmodiophoridae* pasižymi tokiais skiriamaisiais bruožais: (i) obligatiniu viduląstelinio parazitizmu; (ii) mitozinėje fazėje „kryžiaus“ formos branduolio pasidalijimu; (iii) zoosporomis su dviem priekiniais nevienodo ilgio žiuželiais; (iv) daugiabranduoliu plazmodžiu; ir (v) ilgai gyvenančiomis ramybės būsenos sporomis (cistomis), kurios dažnai sudaro sankaupas (Adams, 1990; Braselton, 1995; Kanyuka ir kt., 2003; Rush, 2003).

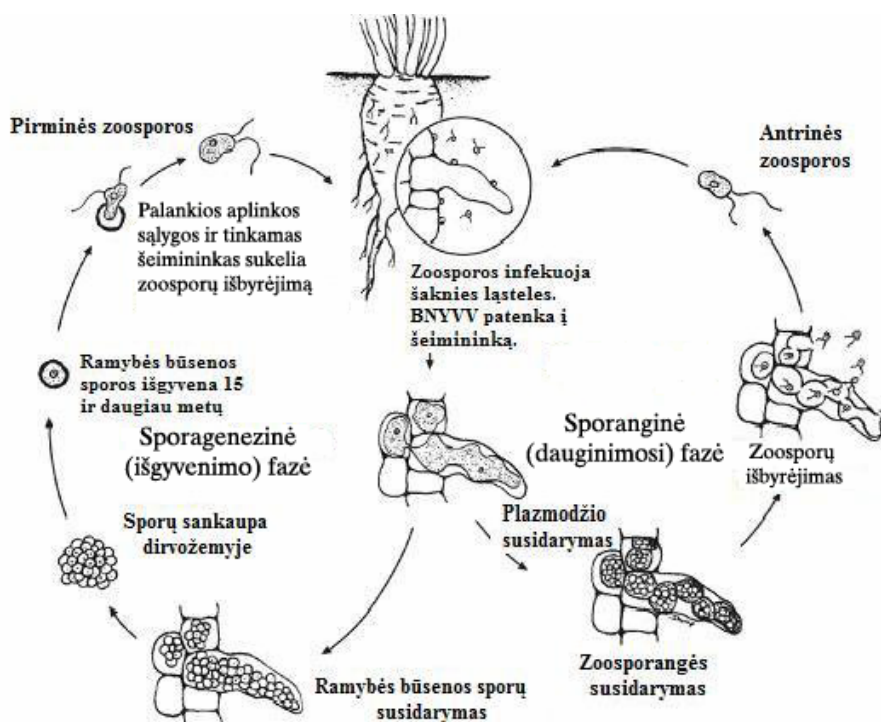
Trys *Plasmodiophoridae* šeimos atstovai (*P. graminis*, *P. betae* ir *S. subterranea*) yra pripažinti kaip augalų virusų pernešėjai. *P. betae* ir *P. graminis* yra morfologiškai labai artimos rūšys, nors neseniai rDNR sekos analizė parodė, kad iš tikrųjų tai yra atskiros rūšys (Ward ir kt., 1998; LeGreve, 2002; Rush, 2003; Rochon ir kt., 2004).

1.2.2. *P. betae* gyvenimo ciklas ir šeiminių spektras

P. betae gyvenimo ciklas turi dvi pagrindines fazes: (i) sporanginę fazę, kuri veda į antrinių zoosporų susidarymą, ir (ii) sporogenezinę fazę, vedančią į pirminių zoosporų per ramybės būsenos sporas susidarymą (Rochon ir kt., 2004). 1.2. paveiksle schematiškai pavaizduotas *P. betae* gyvenimo ciklas.

Kiekviena fazė yra inicijuojama zoosporų įsiskverbimu į augalo ląsteles. Esant palankioms sąlygoms, *P. betae* ramybės būsenos sporos išleidžia judrias su dviem žiuželiais zoosporas, kurios gali plaukioti nedidelius atstumus, kol suranda tinkamą šeiminių. *P. betae* zoosporos neša viruso daleles savo viduje, o ne pritvirtindamos jas prie išorinės zoosporos ląstelių sienelės

(Campbell, 1996). Kai tik atsiranda kontaktas su imliomis augalo – šeimininko ląstelėmis, paprastai šakniaplaukiais arba kitomis epidermio ląstelėmis, (I) pirminės zoosporos kartu su viruso dalelėmis sudaro cistą ant šeimininko ląstelės sienelės. Zoosporų cista, prikibusi prie šaknies paviršiaus, išlieka ten bent 1-2 val. prieš išvirkšiant zoosporų citoplazmas į šeimininko ląstelės vidų (Keskin, 1964; Rush, 2003). (II) tokioje zoosporos cistoje susidaro vamzdelio formos struktūra, kuri turi į „durklą“ panašų darinį (Rush, 2003; Rochon ir kt., 2004; Rush ir kt., 2006). (III) Nuo cistos susidaro išauga, kuri kontaktuoja su šaknų ląstelėmis. (IV) Vyksta staigi „durklo“ injekcija ir zoosporos turinys perkliamas iš cistos per išaugą, šeimininko ląstelės sienelę ir plazminę membraną į augalo šaknies ląstelių citoplazmą (Keskin ir Funchs, 1969; Rochon ir kt., 2004).



1.2. pav. *P. betae* gyvenimo ciklas. Rizomanija išsivysto, kai zoosporos, nešančios BNYVV, įneša virusą į cukrinių runkelių šaknies ląsteles. Tada vyksta abu procesai: tiek viruso replikacija, tiek grybo pagrindinės fazės, nulemiančios BNYVV užkrėstų antrinių zoosporų ir ramybės būsenos sporų susidarymą. Virusas gali išlikti 15 ir daugiau metų ramybės būsenos sporų viduje (pagal Franc ir kt., 1997).

Ląstelių viduje pirminių zoosporų turinys patiria „kryžiaus“ formos branduolio pasidalijimą ir išsivysto į daugiabranduolį plazmodį. Toks plazmodis vėliau išsivysto arba į sporanginį plazmodį, kuris išlaisvina antrines zoosporas ir jos gali pakartoti infekcijos ciklą; arba į sporogeninį plazmodį, kuris pavirsta į ramybės būsenos sporų sancaupą.

Sporanginėje fazėje branduolys dalyvauja ne „kryžiaus“ formos mitoziniame pasidalijime. Plazmodis dėl to skyla į segmentus ir suformuoja zoosporangių sancaupą. Zoosporangės sudaro išėjimo vamzdelius, kurie ištirpsta atidarydami šeimininko ląstelių sienelės, ir antrinės zoosporos gali būti išleidžiamos į dirvožemio aplinką arba beveik iš karto sudaryti cistą ir įsiskverbti į gretimas ląsteles. Tada šios zoosporos pradeda kitą infekcijos ciklą, sudarydamos arba sporanginį, arba sporogeninį plazmodį. Dėl šios priežasties žievės ląstelės infekuojamos ir neretai šalutinėse šaknelėse beveik kiekviena žievės ląstelė yra užkrėsta (Rush, 2003).

Per sporogenezinę fazę branduolys dalyvauja „kryžiaus“ formos dalijimesi, po kurio vyksta mejozė. Sporogenis plazmodis skyla į segmentus ir suformuoja vienląsčių ramybės būsenos sporų sancaupą. Individuali ramybės būsenos spora gali sudaryti pirminę zoosporą, kuri gali inicijuoti kitą infekcijos ciklą, susidarant sporanginiam plazmodžiui (Cambell, 1996; Rush, 2003; Rochon ir kt., 2004; Verchot-Lubicz ir kt., 2007).

Storomis sienelėmis padengtos ramybės būsenos sporos dažnai išlieka šaknų nuolaužose dirvožemyje po derliaus nuėmimo. Šios sporos plinta su dirvos dalelėmis, kurios prilimpa prie žemės ūkio padargų, traktorių ir/arba prie nuimto derliaus šaknų ir tokiu būdu gali būti pernešamos iš vieno lauko į kitą. Taip pat sporos su paviršiniu vandens pertekliumi gali būti nuplautos į lauko įdubimus arba su drenažo vandeniu nuneštos į didesnius vandens telkinius, iš kurių imamas vanduo pasėliams laistyti (Heijbroek, 1987; Asher, 1993). Esant palankioms sąlygoms, drėgnam dirvožemiui ramybės būsenos sporos gali sudyti ir produkuoti pirmines zoosporas, kurios, savo ruožtu, gali infekuoti naujas šaknis ar augalus. Taip prasideda naujas infekcijos ciklas (Rush, 2003).

Nors *P. betae* gali išgyventi gana plačiose pH ribose, tačiau rizomanija stipriausiai pasireiškia dirvožemyje, kurio pH 6,5. Sporų išgyvenimas nėra veikiamas dirvožemio pH, bet rūgštiniai dirvožemiai slopina ramybės būsenos sporų sudygimą ir sumažina zoosporų aktyvumą bei išlikimą (Rush, 2003). Labai nusaustas dirvožemis paprastai sumažina infekciją, o sunkus, skurdžios struktūros dirvožemis, lėtai sausėja ir stabdo šaknų augimą, padidina infekciją. Optimali dirvožemio temperatūra palanki *P. betae* šaknų infekcijai yra 20-25° C, 10° C – minimali, o 28-30° C – maksimali. Laiko tarpas nuo infekcijos pradžios iki sporų sankaupų susidarymo yra 9 dienos 15° C, 6 dienos – 20-25° C bei 15 dienų esant 30° C temperatūrai, tačiau greičiausiai augalai užsikrečia infekuotame dirvožemyje esant 25° C temperatūrai (Blunt, 1991).

P. betae ir *P. graminis* yra morfologiškai glaudžiai susiję, todėl abu *Plasmodiophoridae* atstovai iš pradžių buvo atskiriami pagal jų šeimininkus (Barr, 1979; Barr ir Asher, 1992; Braselton, 1995). Dabar klasifikavimas remiasi molekulinio apibūdinimu, kurio dėka griežtai atskiriami abudu *Plasmodiophoridae* atstovai ir panaikinama hipotezė, kad *P. betae* yra speciali *P. graminis* forma (LeGreve ir kt., 1998; 1999; 2000; 2002). *P. betae* turi gana nedidelį šeimininkų spektrą, kuris apribotas *Chenopodiaceae* Vent., *Amaranthaceae* Juss., *Caryophyllaceae* Juss., ir *Portulacaceae* Juss. šeimų rūšimis. *P. graminis* turi daug didesnę šeimininkų spektrą ir gali užkrėsti tiek vienskilčius, tiek dviskilčius augalus.

Iš vieno lauko dirvožemio gauta *P. betae* populiacija gali būti labai heterogeninė. Atskirų *P. betae* izoliatų specifiškumas labai varijuoja priklausomai nuo šeimininko. Izoliatai, gauti iš tam tikros augalų rūšies, gali neužkrėsti augalų, priskiriamų kitoms imlioms šeimoms ar net tai pačiai šeimai priklausančių kitų augalų (Barr, 1979; Abe ir kt., 1986; Barr ir Asher, 1992). Pavyzdžiui, buvo įrodyta, kad *P. betae* izoliatai iš *Amaranthus retroflexus* L. ir *Portulaca oleracea* L. užkrečia tik *Amaranthaceae* ir *Portulacaceae* šeimų rūšis. Panašiai, *P. betae* iš *Chenopodium album* L., augančių Kanados dirvožemyje, užkrėtė špinatus, bet ne cukrinius runkelius, tuo tarpu kai *P. betae* izoliatai iš *C. album*, augintų dirvožemyje iš Europos, užkrėtė ir špinatus,

ir cukrinius runkelius, o taip pat ir keletą kitų rūšių augalų (Rush, 2003). Skirtingai nuo D. Barr (1979) aprašymo, šie izoliatai turėjo palyginti platų šeimininkų spektrą, bet užkrečiantys skirtingų rūšių augalus, ir buvo atskirti kaip biotipai (Barr ir Asher, 1992). Rizomanijos išsivystymui taip pat yra svarbus pernešėjo agresyvumas. Nustatyta, kad *P. betae* izoliatai, gauti iš skirtingų geografinių vietovių, skiriasi agresyvumu bei viruso pernešimo gebėjimu (Gerik, 1988; Rush, 2003).

1.2.3. Virusų-pernešėjo sąveika

Yra žinomi du skirtingi viruso plitimo grybiniais pernešėjais būdai: *in vitro* ir *in vivo* pernešimas (Campbell, 1996). BNYVV yra pernešamas *in vivo* būdu (Abe ir Tamada, 1986; Adams, 1991; Campbell, 1996).

Tipiška *in vitro* pernaša yra tarp *Olpidium brassicae* (Woronin) ir tabako nekrozės viruso (*Tobacco necrosis virus*, TNV), kai viruso perdavimas yra mažiau priklausomas nuo pernešėjo. *O. brassicae* neša TNV daleles, kurios yra tik absorbuotos ant zoosporos membranos paviršiaus. Patekęs į šeimininko ląstelės citoplazmą, virusas pasidaugina ir sukelia ligą, visiškai nepriklausomai nuo pernešėjo. Kai grybo gniužulas subręsta, viruso dalelės neprisikabina prie jo ir neišsijungia į ramybės būsenos sporas. Žūvant augalo šeimininko ląstelėms, avirulentinės ramybės būsenos sporos ir TNV dalelės pasklinda dirvožemyje (Campbell, 1996; Rush, 2003).

Benyviruses ir visi kiti virusai, pernešami *Plasmodiophoridae*, yra perduodami *in vivo* būdu (Barr, 1982; Abe ir Tamada, 1986; Adams, 1991; Campbell, 1996; Rush, 2003). Virusų dalelės išgyvena ramybės būsenos sporos viduje ir yra pernešamos virulentinių zoosporų viduje. Zoosporos yra išlaisvinamos iš ramybės būsenos sporų ar zoosporangių, o, esant kontaktui su imliu šeimininku, zoosporos infekuoja ląsteles. Jei zoosporos yra virulentinės, viruso dalelės patenka į augalų citoplazmą iš karto po to, kai zoosporos turinys įsvirkščiamas į ląstelę. Virusas pradeda savo replikaciją ir genomo ekspresijos ciklą, įskaitant viruso judėjimą į kaimynines ląsteles. Net jeigu nevirulentinė

zoospora infekuoja ląstelę, kuri jau yra užkrėsta virusu, susidaręs plazmodis inkorporuos virusą. Jei šis plazmodis išsivystys į zoosporangę, antrinės zoosporos bus virulentinės. Jei plazmodis išsivystys į sporų sancaupą, virusas galės ilgai išgyventi ramybės būsenos sporose, o iš jų susidariusios pirminės zoosporos bus virulentinės (Rush, 2003).

Literatūros duomenimis *Plasmodiophoridae* transmembraninės sritys, esančios ištisinio skaitymo rėmelio baltyme, gali turėti įtakos palengvinant viruso dalelės judėjimą per membraną (Adams ir kt., 2001).

Tiesioginiai virusų buvimo zoosporose ir sporangėje įrodymai yra gauti su BNYVV ir miežių silpnosios mozaikos virusu (*Barley mild mosaic virus*, BaMMV) bei ramybės būsenos sporose – su BNYVV (Chen ir kt., 1991; Dubois ir kt., 1994; Verchot-Lubicz ir kt., 2007). Visuotinai pripažinta, kad BNYVV nevykdo replikacijos *P. betae* viduje (Abe ir Tamada, 1986; Richards ir Tamada, 1992), tačiau pastaruoju metu gauti įrodymai leidžia daryti prielaidą, kad replikacija *P. betae* viduje vis dėl to galėtų vykti (Verchot-Lubicz ir kt. 2007). Imunofluorescenciniu mikroskopu *P. betae* ramybės būsenų sporų ir zoosporų viduje buvo surasti BNYVV baltymai, dalyvaujantys viruso replikacijoje, viruso surinkime ir viruso judėjime. Tai parodo, kad viruso transliacija gali vykti ir pernešėjo viduje. BNYVV baltymai buvo išskirti tiek sporogenezinėje, tiek sporanginėje *P. betae* gyvenimo ciklo fazėse. Yra du galimi visų šių BNYVV baltymų egzistavimo *P. betae* viduje paaiškinimai. Pirmas modelis, pasiūlytas R. Cambell, teigia, kad *Polymyxa* ir augalo ląstelių citoplazmos turi galimybę susimaišyti prieš membranoms sudarant sporanginį plazmodį, todėl viruso baltymai gali laisvai pereiti į pernešėją (Campbell 1996; Verchot-Lubicz ir kt., 2007). Alternatyviai buvo pasiūlytas kitas modelis, teigiantis, kad *P. betae* yra ir BNYVV šeimininkas, ir jo pernešėjas. Virusų replikazė, aptikta pernešėjo ramybės būsenų sporų ir zoosporų viduje, parodo, kad virusas gali replikuotis ir pernešėjo viduje. Tačiau šie įrodymai reikalauja tolesnių tyrinėjimų, leisiančių nustatyti, ar *P. betae* iš tikrųjų yra BNYVV šeimininkas, ar tiesiog priemonė viruso pernešimui (Rush, 2003; Verchot-Lubicz ir kt., 2007).

Taigi, šiuo metu viruso pernešimo/perdavimo mechanizmai dar nėra pilnai išaiškinti (Dessens ir Meyer, 1996; Tamada ir kt., 1996; Diao ir kt., 1999; Adams ir kt., 2001).

1.3. Runkelių nekrotinio gyslų pageltimo virusas – BNYVV

Pasėliuose, ankstyvo cukrinių runkelių augimo sezono metu, pirmieji BNYVV sukelti simptomai atrodo kaip šviesiai žalios ar geltonos spalvos netaisyklingos dėmės (1.3. pav. A). Šios dėmės laukuose dažniausiai pasiskirsto ta pačia kryptimi, kaip ir laukus apdirbęs plūgas ar kiti žemės ūkio padargai bei parodo infekcijos plitimą dirvožemyje. Užkrėstos cukrinių runkelių šaknys nebegali efektyviai įsisavinti vandens ir maistinių medžiagų, todėl runkelių lapai paprastai tampa šviesiai geltonos spalvos su ilgais lapkočiais ir auga vertikalia kryptimi.



A

B

1.3. pav. Tipiški rizomanijos simptomai: A – laukuose: geltona dėmė rodo užsikrėtusius cukrinius runkelius. B – užkrėstų šaknų simptomai: sumažėjusi šaknis, padidėjęs antrinių šaknelių kiekis (pagal OEPP/EPPO, 2004).

Stipriai užkrėstų augalų liemeninė šaknis ir šoninės antrinės šaknelės nekrozuoja ir gali suteikti šakniai į „barzdą“ panašią išvaizdą (1.3. pav. B). Užkrėstos šaknys daugeliu atvejų yra pajuodusios (Richards ir Tamada, 1992). Liemeninė šaknis gali būti stipriai sumažėjusi, susiaurėjusi ir panaši į vyno taurės formą. Retkarčiais liemeninė šaknis būna supuvusi (Tamada ir Baba, 1973; Asher, 1993). Daugeliu atvejų dėl sumažėjusio maistinių medžiagų

įsisavinimo padaryta žala šakniai sukelia simptomus lapuose (McGrann ir kt., 2009). Retais atvejais BNYVV infekcija tampa sisteminė, ir lapai rodo simptomų įvairovę. Jų tarpe gali būti lapų geltonavimas, raukšlėtumas, vytimas ir gyslų pageltimas. Pagal šiuos simptomus virusui buvo duotas jo pavadinimą (Tamada ir Baba, 1973).

Azoto perteklius gali maskuoti lapijos simptomus. Kai kuriems užkrėstiems augalams simptomai lapuose niekada nepasireiškia. Rizomanijos simptomų išraiška ant šaknų gali skirtis nuo beveik jokių požymių iki klasikinių simptomų išsivystymo. Pagrindiniai rizomanijos simptomai yra cukrinių runkelių šaknų sutankėjimas, kuokštiškumas, žemaūgiškumas, raukšlėtumas, vytimas, lapų chlorozė, gyslų pageltimas bei nekrozė. Cukriniai runkeliai yra imlūs infekcijai per visą vegetacijos periodą, bet liga jiems yra pavojingiausia ankstyvoje augimo fazėje. Tai nulemia šaknų derliaus, cukraus kiekio ir sulčių grynumo sumažėjimą. Derliaus nuostoliai priklauso nuo cukrinių runkelių veislės ir aplinkos veiksnių. Cukraus išėigos nuostolis svyruoja 50-60 % ribose, nors yra nustatyti nuostoliai iki 70 % (Prancūzijoje), 79 % (Anglijoje) ir 84 % (JAV) (Richard-Molard, 1985; Henry, 1996; Scholten ir Lange, 2000; Morris et.al., 2001). Šiuos derliaus nuostolius gali nulemti net iki 50 % sumažėjęs šaknų svoris bei sumažėjęs cukraus kiekis jose (gali sumažėti nuo 8 % iki 48 %) (Henry, 1996). Vėlyvesnė infekcija dažnai nesukelia jokių pastebimų šaknų pažeidimo simptomų, tačiau gali žymiai sumažinti cukraus kiekį.

Naujausia infekuotų BNYVV cukrinių runkelių proteomikos analizė parodė abscizo rūgšties ir auksino fitohormonų indukciją. Šie fitohormonai gali dalyvauti susidarant charakteringam rizomanijos simptomui – šaknies sutankėjimui (Larson ir kt., 2008).

Rizomanija taip pat paveikia ir cukrinių runkelių derliaus saugojimo galimybes. BNYVV infekcija gali padidinti natrio ir sumažinti α -amino-azoto koncentraciją cukriniuose runkeluose. Tokie pokyčiai apsunkina cukraus ekstrakciją ir sumažina cukrinių runkelių kaip cukraus šaltinio panaudojimą

(Heijbroek, 1989; Scholten ir Lange, 2000; Strausbaugh ir kt., 2008; McGrann ir kt., 2009).

Rizomanija gali plisti į neužkrėstą ar mažiau užkrėstą lauką per sėklines bulves ir svogūnus, žemės ūkio mašinas, drėkinimą, patvinimą ir vėjo eroziją (Asher, 1993).

Užkrečiant cukrinių runkelių šaknis avirulentišku *P. betae*, žala minimali. Rizomanijos paplitimas ir sunkumas gali būti sumažintas gerinant sanitarijos sąlygas, tačiau efektyviausias ligos valdymas yra atsparių veislių panaudojimas (Wisler ir kt., 1999; Biancardi ir kt., 2002; Harveson ir kt., 2002; Rush ir kt., 2006).

1.3.1. Virusų taksonomija

1987 m. Tarptautinis virusų taksonomijos komitetas (ICTV) apibrėžė *Furovirus* genties narius, kaip grybais pernešamus, lazdelės formos virusus, susidedančius iš dviejų dalių vv RNR genomo. Šiuos narius siejo daug fizinių ir biologinių savybių, tačiau kitos jų savybės (RNR rūšių skaičius, poliadenilimas, serologinės savybės, nukleotidų seka ir genomo organizacija) skyrėsi (Fauquet ir kt., 1988; Scott ir kt., 1994; Kashiwazaki ir kt., 1995; Koenig ir kt., 1996; Heidel ir kt., 1997; Torrance ir kt., 1997; Lu ir kt., 1998; Shirako ir kt., 2000). Remiantis šiais skirtumais, *Furovirus* gentis buvo peržiūrėta ir padalinta į keturias atskiras gentis – *Furovirus*, *Pomovirus*, *Pecluvirus* ir *Benyvirus*, jų nepriskiriant jokiai šeimai (Torrance ir kt., 1997; Mayo, 1999; Shirako ir kt., 2000).

Taigi, nuo 1997 m. pagal ICTV BNYVV priskiriamas *Benyvirus* genčiai. Neseniai ICTV patvirtino naują *Virgaviridae* augalų virusų šeimą. Šeimos pavadinimas kilo dėl lazdelės formos virionų dalelių (lotyniškai virga = lazdelė). Ją sudaro *Furovirus*, *Hordeivirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus*, *Tobamovirus* ir *Tobravirus* gentys. Tik vienintelė *Benyvirus* gentis su lazdelės formos virionų dalelėmis buvo neįtraukta į šį šeimos sąrašą. Pagal filogenetinę polimerazės analizę *Benyvirus* gentis yra labiau nutolusi nuo kitų *Virgaviridae*

šeimos narių. Be to, *Benyvirus* nariai (skirtingai nuo kitų) turi poliadenilintą genomą ir polimerazę, kuri yra autokatalitiškai proteazės apdorojama (Adams ir kt., 2009).

BNYVV virionai susideda iš 4-5 skirtingo ilgio lazdelės formos dalelių, padengtų apvalkalo baltymu. Jo teigiamai (+) superspiralizuotas vvRNR genomus sudarytas iš keturių RNR (RNR 1, RNR 2, RNR 3, RNR 4), o kartais penkių RNR. RNR 5 randama tik kai kuriuose viruso izoliatuose (Bouzoubaa ir kt., 1985, 1986, 1987; Tamada ir kt., 1989; Kiguchi ir kt., 1996; Fauquet ir kt., 2005).

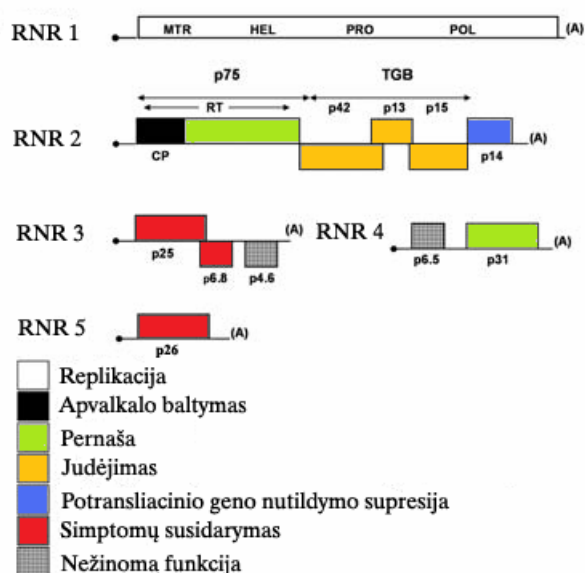
1.3.2. BNYVV genomo struktūra ir savybės

Runkelių nekrotinio gyslų pageltimo virusas yra tipinis *Benyvirus* genties atstovas. Teigiamai superspiralizuotos vvRNR tiesios lazdelės formos dalelės yra 20 nm diametro ir penkių modalinių ilgių nuo 80 iki 390 nm. Kiekviena RNR rūšis 5' gale turi kepurėlę (*angl.* cap), o 3' galas – poliadenilintas (Richards ir Tamada, 1992). Visi BNYVV izoliatai turi RNR 1-RNR 4 rūšis, o kai kurie iš Europos ir Azijos dirvožemių išskirti izoliatai turi papildomą RNR 5 (1.4. pav.).

RNR 1 sudaro vienas didelis atviro skaitymo rėmelis (ORF), kuris yra 6746 nt ilgio, koduoja vienintelį baltymą – P237 (237 kDa dydžio) ir turi nuo RNR priklausomą RNR polimerazę (RdRp), reikalingą viruso replikacijai (Bouzoubaa ir kt., 1987; Richards ir Tamada, 1992). Tai atskiria benyvirusus nuo visų kitų lazdelės formos virusų, kurie turi savo su replikacija susijusius baltymus, koduojamus dviejų ORF (Fauquet ir kt., 2005). P237 yra po translacijos autokatalitiškai kerpamas į P150 ir P66. P150 baltymas turi metiltransferazės, helikazės ir į papainą panašios proteazės domenų, tuo tarpu visas polimerazės domenų yra P66 baltyme (Hehn ir kt., 1997).

RNR2 yra 4612 nt ilgio ir turi šešis ORF (Bouzoubaa ir kt., 1986). Proksimalinis 5' ORF koduoja 21-kDa pagrindinį apvalkalo baltymą (CP), atskirtą nuo antro 54-kDa ORF silpnu (amber) galiniu kodonu, kuris apie 10 % slopinamas translacijos metu, susidarant 75-kDa sulietam baltymui,

vadinamam P75 ištisinio skaitymo baltymu (Schmitt ir kt., 1992). N-galinė p75 dalis koduoja minorinį CP, svarbų lazdelės formos BNYVV virionų formavimui, o C-galinė šio ištisinio skaitymo baltymo dalis yra būtina *P. betae* pernešimui. Vykiant serijas BNYVV izoliatų perkrėtimų ant eksperimentinių *Chenopodium quinoa* Willd ir *Tetragonia expansa* Murr indikatorinių augalų lapų mechaninio perdavimo būdu, įvyksta delecija RNR 2 antrame ORF, kuri sutrikdo viruso pernešimą grybu (Tamada ir Kusume, 1991; Koenig, 2000). Tolesnė šios srities analizė parodė KTER motyvą, kuris yra esminis veiksmingam viruso pernešimui (Tamada ir kt., 1996b).



1.4. pav. Beet necrotic yellow vein virus genomai. Penkios RNR rūšys turi kepurės struktūrą 5' gale ir poliA liekaną – 3' gale. RNR 5 turi tik BNYVV P- ir J-tipai. Kiekviena dėžutė vaizduoja atviro skaitymo rėmelį (ORF) genome. MTR – metiltransferazė; HEL – helikazė; PRO – proteazė; POL – polimerazė; CP – apvalkalo baltymas, RT – ištisinio skaitymo baltymas, TGB – trigubas genų blokas, (pagal McGrann ir kt., 2009).

Plasmodiophoridae pernešamų *Benyvirus*, *Furovirus* ir *Pomovirus* virusų RNR2 ištisinio skaitymo baltymo gene delecijos, sutrikdančios virusų pernešimą, atrodo yra dažnos. Šis reiškinys taip pat buvo stebimas kituose *Plasmodiophoridae* pernešamuose virusuose, kurie neturi ištisinio skaitymo baltymo. Pavyzdžiui, *Bymovirus* ir *Pechuvirus* gentyse. Yra iškelta hipotezė,

kad šios *Plasmodiophoridae* pernešamų virusų genomo sritys koduoja transmembraninius domenų, kurie dalyvauja prisijungime prie pernešėjo plazmolemos ir padeda perduoti virioną tarp augalų ir pernešėjo citoplazmų (Adams ir kt., 2001). P75 taip pat dalyvauja nukreipiant virusą į šeimininko ląstelių mitochondrijas (Erhardt ir kt., 2001; Valentino ir kt., 2005).

Centrinė RNR 2 sritis turi grupę trijų persidengiančių ORF, vadinamų "trigubu genų bloku" (TGB). Šis TGB koduoja 42, 13 ir 15 kDa baltymus, kurie yra reikalingi veiksmingam BNYVV judėjimui iš ląstelių į ląsteles (Gilmer ir kt., 1992). Manoma, kad P13 ir P15 baltymai yra susiję su infekuotų augalų ląstelių membrana (Erhardt ir kt., 2005). Abu jie yra reikalingi augaluose P42 nukreipimui į plazmodezmą, kad virusas galėtų judėti tarp ląstelių (Erhardt ir kt., 2000). Galinis RNR 2 ORF koduoja nedidelį (14-kDa) cisteinu turtingą baltymą P14, kuris reguliuoja RNR 2 kaupimąsi ir, manoma, kad augaluose veikia kaip potransliacinio genų nutildymo supresorius (Hehn ir kt., 1995; Dunoyer ir kt., 2002).

RNR 1 bei RNR 2 yra būtini BNYVV infekcijai ir dažnai vadinami viruso "namų genais". Tuo tarpu RNR 3, RNR 4 ir RNR 5 koduoja baltymus, kurie dalyvauja natūralioje infekcijoje ir išgyvenimo mechanizmuose, įskaitant infekcijoje dalyvaujantį pernešėją, viruso dauginimąsi, o taip pat ligos simptomų susidarymą (Richards ir Tamada, 1992).

RNR 3 susideda iš 1775 nt ir koduoja 25 kDa baltymą (P25), kuris po lapų inokuliacijos nulemia augalų šeimininkų lapijos simptomų pasireiškimą (Bouzoubaa ir kt., 1985; Jupin ir kt., 1992; Chiba ir kt., 2003). Jis taip pat yra reikalingas siūlinių šaknelių dauginimuisi, vykstant natūraliai cukrinių runkelių infekcijai (Koenig ir kt., 1991; Tamada ir kt., 1999). Dėl to, manoma, kad RNR 3 yra BNYVV patogeniškumo determinantas, o P25 yra atsakingas už cukriniams runkeliams sukeltus rizomanijos simptomus (Jupin ir kt., 1991; Chiba ir kt., 2008). Stiprūs nekroziniai simptomai atsiranda po mechaninės lapų inokuliacijos, kai P25 baltymas patenka ir į šeimininko ląstelės citoplazmą, ir į branduolio kompartmentus (Vetter ir kt., 2004). A. Schirmer ir kt. (2005) identifikavo BNYVV izoliatą, kuris turėjo pokyčius P25 baltymo

aminorūgščių tetradoje (67-70 padėtyse). E. Klein ir kt. (2007) parodė, kad variacijos šiose aminorūgštyse turi įtakos diagnostinio *T. expansa* šeimininko patogeniškumui. Be to, naujausiais duomenimis P25 baltymas gali veikti kaip avirulentinis taikyns, atpažįstamas kai kurių BNYVV atsparių cukrinių runkelių linijų mechaniškai inokuliuotuose lapuose (Chiba ir kt., 2008).

RNR 3 koduoja ir du kitus baltymus: P6.8, kuris taip pat dalyvauja susidarant nekroziniams simptomams augaluose; ir P4.6, kurio funkcija yra nežinoma (Jupin ir kt., 1991, 1992).

RNR 4 yra 1431 nt ilgio ir susideda iš dviejų ORF (Bouzoubaa ir kt., 1985). Pagrindinis ORF koduoja 31-kDa baltymą (P31), kuris yra būtinas siekiant užtikrinti efektyvų viruso perdavimą *P. betae* (Tamada ir Abe, 1989). Kitas ORF koduoja 6,5-kDa nežinomos funkcijos baltymą. P31 taip pat yra susijęs su tokiais infekcijos procesais, kaip padidėjusi BNYVV simptomų išraiška *Nicotiana benthamiana* Domin šeimininke. Šiuo atveju buvo parodyta, kad RNR 4 labiau nei RNR 3 yra susijusi su stipria simptomų išraiška, vykstant BNYVV tarpininkaujančioje RNR nutildymo supresijoje šaknyse (Rahim ir kt., 2007). Manoma, kad P14 ir P31 baltymai yra reikalingi specifiskai slopinant RNR nutildymą lapuose ir šaknyse.

Penktoji RNR rūšis, **RNR 5**, randama tik kai kuriuose BNYVV izoliatuose, išskirtuose Azijoje, Prancūzijoje ir Jungtinėje Karalystėje (Tamada ir kt., 1989; Koenig ir kt., 1997; Koenig ir Lennefors, 2000; Harju ir kt., 2002; Ward ir kt., 2007). RNR 5 turi vieną 1342-1347 nt ilgio ORF ir koduoja 228-aminorūgščių baltymą P26, kurio geno sekos ilgis skiriasi Japonijos ir Europos izoliatuose. Atrodo, P26 iš dalies yra nukreiptas į infekuotos šeimininko ląstelės branduolio kompartmentą (Kiguchi ir kt., 1996; Koenig ir kt., 1997; Miyanishi ir kt., 1999; Link ir kt., 2005). Izoliatai, turintys RNR 5, yra labiau patogeniški nei tie, kurie turi tik RNR 1 – RNR 4 (Tamada ir kt., 1989; Heijbroek ir kt., 1999; Tamada ir kt., 1996a). Padidėjęs šių izoliatų patogeniškumas gali būti siejamas su augale P26 baltymo aktyvuota viruso transkripcija, nors tai dar nėra patvirtinta (Link ir kt., 2005). Įdomu tai, kad izoliatai, turintys RNR 5, bet neturintys RNR 3, cukriniams runkeliams sukelia

į rauples panašius simptomus. Tai rodo, kad abi RNR yra reikalingos rizomanijos simptomų išsivystymui, nors ir turi skirtingus vaidmenis (Tamada ir kt., 1996a).

1.3.3. BNYVV kintamumas, pagrindiniai tipai

BNYVV yra trijų pagrindinių (A, B ir P) tipų, kurių negalima atskirti serologiškai. Todėl BNYVV tipams nustatyti taikomi vienvijės konformacijos polimorfizmo (*angl.* single-strand conformation polymorphism (SSCP)), restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo (*angl.* restriction fragment length polymorphism (RFLP)) analizės metodai. BNYVV tipus galima nustatyti ir pagal filogenetinį giminingumą (Kruse ir kt., 1994; Koenig ir kt., 1995; Schirmer ir kt., 2005).

RNR 2 koduojamas apvalkalo baltymas 62, 103 ir 172 padėtyje turi svarbias aminorūgščių liekanas pagal kurias galima atskirti A tipo (T_{62} , S_{103} , L_{172}) izoliatus nuo B tipo (S_{62} , N_{103} , F_{172}) izoliatų (Kruse ir kt., 1994; Koenig ir kt., 1995; Miyanishi ir kt., 1999). A ir B yra panašūs tipai, tačiau turi skirtingą geografinį paplitimą. Pavyzdžiui, A tipas yra paplitęs visame pasaulyje (Europos šalys, Iranas, Š. Amerika, Kinija, Japonija), o B tipo paplitimas labiau ribotas. B tipo virusų rasta Prancūzijoje, Vokietijoje ir kai kuriais atvejais Švedijoje, Kinijoje bei Japonijoje (Saito ir kt., 1996; Miyanishi ir kt., 1999; Lennefors ir kt., 2000; Sohi ir Maleki, 2004). B tipas taip pat buvo aptiktas ir Jungtinėje Karalystėje bei Švedijoje, į kur BNYVV, manoma, buvo atvežtas iš įvairių užsieninių šaltinių (Koenig ir kt., 1995; Miyanishi ir kt., 1999; Lennefors ir kt., 2000). BNYVV A ir B tipų sekų skirtumas yra nedidelis, nukleotidų identiškumas svyruoja 96-99 % intervale (Saito ir kt., 1996; Koenig ir Lennefors, 2000). Buvo parodyta, kad visame pasaulyje išskirtuose BNYVV A ir B tipo izoliatuose CP geno seka yra ypač konservatyvi (Schirmer ir kt., 2005). Tačiau viruso genome yra sričių (pavyzdžiui, RNR 2 TGB), specifinių A ir B tipo virusams. Tai leidžia panaudoti polimerazinę ciklinę reakciją (PCR) BNYVV tipų diagnostikai (Ratti ir kt., 2005). Nors buvo skelbta, kad šių dviejų tipų patogeniškumas

nesiskiria, visgi buvo parodyta, kad BNYVV A tipas cukriniams runkeliams yra šiek tiek daugiau patogeniškas nei B tipas, o BNYVV P tipas, atrodo, yra žymiai patogeniškesnis už A ir B tipus (Heijbroek ir kt., 1999; Rush ir kt., 2006).

P tipo BNYVV izoliatai pirmą kartą buvo surasti Pithiviers rajone Prancūzijoje. R. Koenig ir kt. (1995) nustatė, kad šis tipas turi RNR 5, kuri anksčiau buvo aprašyta kai kuriuose izoliatuose Japonijoje (Tamada ir kt., 1989). Šis tipas taip pat buvo surastas Jungtinėje Karalystėje ir Kazachstane (Koenig ir Lennefors, 2000; Harju ir kt., 2002). Nors RNR 5 buvimas izoliatė neparodo BNYVV P tipo, tačiau RNR 5 iš P tipo izoliatų paprastai pasižymi apie 96 % sekos identiškumu RNR 5 iš Rytų Azijos izoliatų (Koenig ir kt., 1997; Miyanishi ir kt., 1999; Ward ir kt., 2007).

A, B ir P tipų BNYVV izoliatų sekų palyginimas parodė, kad A ir P tipai yra panašesni už B tipą (Koenig ir Lennefors, 2000; Meunier ir kt., 2005; Ratti ir kt., 2005; Schirmer ir kt., 2005). Manoma, kad BNYVV A ir B tipai nutolo vienas nuo kito seniai, o P tipas išsivystė iš A tipo viruso (Tamada ir kt., 2003).

BNYVV P tipas augaluose juda daug greičiau, nei A arba B tipai, o iš dalies atspariose veislėse stebimas daug ryškesnis šaknų pažeidimas lyginant su analogiškais augalais, užkrėstais A arba B tipo virusais (Heijbroek ir kt., 1999). Taip pat yra manoma, kad BNYVV P tipas gali būti agresyvesnis nei kiti virusų tipai, o taip pat jis gali išvengti augalų apsaugos atsakų aktyvinimo (Klein ir kt., 2007). Todėl BNYVV P tipas gali būti žalingas cukriniams runkeliams tose pasaulio šalyse, kuriose rizomanijos kontrolė grindžiama virusui atsparių runkelių veislių naudojimu.

Neseniai JAV buvo pastebėti ryškūs rizomanijos simptomai iš dalies atspariuose cukriniuose runkeliuose (Liu ir kt., 2005). Dideli BNYVV užkrato kiekiai dirvoje kartu su aplinkos sąlygomis, palankiomis ligos vystymuisi, gali baigtis dalinio rizomanijos atsparumo susilpnėjimu (Asher ir kt., 2002). Tačiau eksperimentai JAV parodė, kad tai nevisada pasitvirtina (Rush ir kt., 2006). Izoliatų, išskirtų iš atsparių augalų, bet rodančių simptomus, molekulinė

analizė parodė, kad jie neturėjo RNR 5 ir buvo panašesni į BNYVV A tipą (Liu ir kt., 2005). Nustatytas didelis panašumas tarp atsparumo-pažeistų izoliatų ir įprastų BNYVV izoliatų sekų (Liu ir Lewellen, 2007). A. Schirmer ir kt. (2005) išanalizavę izoliatų iš viso pasaulio P25 baltymo sekas nustatė, kad izoliatai, išskirti iš augalų, kuriuose atsparumas BNYVV buvo pažeistas, pasižymėjo didele sekos variacija. Tai rodo, kad P25 baltymas gali lemti atsparumo pažeidimą. JAV izoliatuose buvo nustatytas nukrypimas P25 baltymo aminorūgščių sekoje 67 ir 68 padėtyse, kuriuose standartiniai izoliatai turėjo AC konservatyvias aminorūgštis, o izoliatuose, kuriuose buvo pažeistas atsparumas – AF, AL, SY, VC, VL ir AC (Liu ir Lewellen, 2007). Keturių aminorūgščių motyvas, apimantis tą pačią sritį, 67-70 liekanas, taip pat turi funkcinį atsparumo pažeidimo vaidmenį (Schirmer ir kt., 2005). Manoma, kad aminorūgštis, esanti P25 baltymo 68 padėtyje, stipriai paveikia augalų šeiminių faktorių prieinamumą, kurie specifiskai atpažįsta šį viruso baltymą ir padeda augalui sukelti gynybos atsaką prieš virusą (Chiba ir kt., 2008). Be to, neseniai atliktos analizės parodė, kad galima teigiama šių aminorūgščių (67-68 padėtyse) pokyčių atranka atsparumo-pažeistuose izoliatuose (Acosta-Leal ir kt., 2008). Įdomu tai, kad Prancūzijoje išskirti P tipo izoliatai turi SYHG motyvą, kuris taip pat buvo rastas ir JAV išskirtuose izoliatuose (Liu ir Lewellen, 2007). Visi šie duomenys rodo, kad pokyčiai šiame aminorūgščių motyve negali būti potencialus atsparumą pažeidžiančių BNYVV izoliatų rodiklis. Tačiau šios srities kintamumas, atrodo, yra susijęs su augalų pasipriešinimo BNYVV silpnėjimu. Visa tai gali padėti išsiaiškinti BNYVV atsparumo pažeidimų mechanizmus (McGrann ir kt., 2009).

1.4. Viruso ir šeimininko sąveika

1.4.1. Ligos paplitimą ir sunkumą įtakojo faktoriai

Dažnai auginimo sezono metu pasėliuose rizomanija aptinkama pagal atsiradusias lokalias fluorescentines geltonas dėmes ant pavienių cukrinių runkelių lapų. Šios „rizomanijos dėmės“ paprastai atsiranda nuo žemės ūki

technikos palikto užkrėsto dirvožemio; dirvožemio su piktžolėmis, likusiomis po ankstesnio derliaus nuėmimo, ar po potvynių, vykusių laukuose netoli upės ir t.t. Kai virulentiškas *P. betae* patenka į neužkrėstą lauką per užkrėstą dirvožemį arba infekuotas cukrinių runkelių liekanas, protistai turi labai aukštą dauginimosi potencialą. Tinkamomis sąlygomis *P. betae* gali daugintis daugiau nei 10000 kartų per vieną auginimo sezoną (Tuitert ir Hofmeester, 1992). Didelis BNYVV titras užkrėstuose augaluose stipriai koreliuoja su užkrato tankiu dirvožemyje (su didele koncentracija virulentiško *P. betae*) ir yra glaudžiai susijęs su pasireiškiančių simptomų stiprumu (Gerik ir Duffus, 1988; Tuitert, 1990; Ciafardini, 1991; Tuitert ir Hofmeester, 1992; Kastirr ir kt., 1994; Tuitert ir kt., 1994; Buttner ir kt., 1995). Dėl to, liga gali gana stipriai pasireikšti ribotame plote, bet silpnai visame lauke, nes užkrato tankis yra mažas, o pernešėjas nėra plačiai paplitęs (Rush ir Heidel, 1995). Kai užkrėstas laukas apdirbamas (arimas, sėjimas ir pan.), virulentinis pernešėjas plinta su dirvožemiu, dėl to, jei liga tinkamai nevaldoma, galimi dideli nuostoliai. Rizomanijos paplitimas laukuose per zoosporų migraciją yra nežymus palyginti su žemės dirbimo, sėjos, drėkinimo ir derliaus nuėmimo darbais (Harveson ir kt., 1996). G. Tuitert (1993) pademonstravo, kad virulentinės *P. betae* zoosporos negali įveikti didesnio nei 5 cm atstumo tarp virusu užkrėstų ir neužkrėstų cukrinių runkelių šaknų. Taigi, didelio tankio ramybės būsenos sporos, kurios gali plisti pernešamo dirvožemio pagalba, rizomaniją laukuose platina labiau nei augalams užsikrečiant per antrines zoosporas (Harveson ir kt., 1996; Tuitert, 1993).

Virulentinio *P. betae* efektyvumas dirvožemyje yra nulemiamas daugybės įvairių biotinių ir abiotinių veiksnių. Dirvožemio temperatūra, drėgmė ir struktūra atlieka svarbius vaidmenis infekcijos plitimo ir viruso perdavimo procesuose. Temperatūra tarp 25° C ir 30° C yra optimali *P. betae* dygstančių cukrinių runkelių daigams infekuoti (Blunt ir kt., 1991). Temperatūra nuo +10° C iki +15° C slopina BNYVV pernešėjo infekciją. Smėlėti dirvožemiai dėl greitesnio atšilimo ypač paspartina *P. betae* zoosporų išbryėjimą (Webb ir kt., 2000). Ankstyva infekcija paprastai nulemia sunkią

pagrindinės šaknies ligą ir derliaus nuostolius. Dirvožemio drėgnumas gali būti svarbus faktorius, lemiantis rizomanijos, o taip pat kitų ligų, kurias sukelia *Plasmodiophoridae* pernešami virusai, sunkumą. Drėkinamame dirvožemyje, palyginus su nedrėkinamu virulentinių sporų užkrato tankis ženkliai padidėja (Tuitert ir Hofmeester, 1992). Be to, nepriklausomai nuo to, ar didelis užkrato tankis, liga pasireišk tik tuo atveju, kai bus tinkamas dirvožemio drėgnumas, galintis stimuliuoti ramybės būsenos sporų daigumą. Didelis dirvožemio drėgnumas yra reikalingas pradinėi infekcijai, todėl kiekvienas kritulių arba drėkinimo atvejis po pradinės infekcijos turi galimybę skatinti antrinių zoosporų išlaisvinimą. Virusų titras yra tiesiogiai susijęs su virulentinių zoosporų užkrato tankiu, o ligos sunkumas tiesiogiai priklauso nuo viruso titro užkratuose augaluose (Buttner ir kt., 1995). Todėl, kuo dažniau virulentinės zoosporos išlaisvinamos, tuo ryškesni ligos simptomai ir didesni derliaus nuostoliai. Ši koncepcija buvo patvirtinta eksperimentiškai ir panaudota plėtojant drėkinimo planus, siekiant sumažinti ligos padarytus nuostolius (Piccinni ir Rush, 2000; Harveson ir Rush, 2002).

Biotinių faktorių, nulemiančių ligos paplitimą, yra daugybė. Ne tik užkrato tankis, bet ir *P. betae* populiacija, vietinė nevirulentinė *P. betae* bei tiek virusui, tiek pernešėjui imlūs šeimininkai yra pagrindiniai faktoriai sėkmingai infekcijai. *P. betae* izoliatai iš įvairių rajonų skiriasi agresyvumu ir viruso pernešimo intensyvumu. Buvo gauta duomenų, kad virulentinės populiacijos efektyviau kolonizuoja šaknis nei avirulentiniai izoliatai, todėl virulentinė populiacija galėtų nukonkuruoti vietines populiacijas (Gerik ir Duffus, 1988). Tačiau, buvo gauta ir priešingų duomenų, rodančių, kad virulentiniai izoliatai yra mažiau agresyvūs, o BNYVV gali sumažinti galutinį sporų sankaupos tankį užkratuose šaknyse ir dirvožemyje (Kastirr ir kt., 1994).

Užkrato tankis yra pagrindinis determinantas, įtakojantis vietinių ar naujų iš šalies patekusių *P. betae* populiacijų dominavimą. Izolatas, kuris pirmas infekuoja šaknų sistemą, turės pranašumą tolesniuose infekcijos cikluose. Jei vietinė avirulentinė *P. betae* populiacija yra nedidelė, nauja patekusi virulentinė populiacija turi galimybę stipriai padidinti savo tankį per

vieną sezoną, nors bendras virulentinės *P. betae* procentas užkrėstame dirvožemyje paprastai yra mažas, nuo 5 % iki 15 % (Ciafardini, 1991; Tuitert ir Hofmeester, 1992; Tuitert ir kt., 1994). Šeimininko imlumas BNYVV turi didelę įtaką viruso užkrato tankio augimui, o trumpa rotacija su imliais šeimininkais labai padidina užkrato tankį (Tuitert ir kt., 1994; Buttner ir kt., 1995; Hugo ir kt., 1996). Tačiau jei lauke, kuriame prieš tai buvo nustatyta rizomanija, yra pasodintos atsparios cukrinių runkelių veislės, bendra virulentinė *P. betae* populiacija liks nedidelė, nebent virusas mutuos į naują virulentišką atmainą, galinčią įveikti genetinį atsparumą (Rush, 2003).

1.4.2. Rizomanijos kontrolė

Šiuo metu nėra veiksmingų priemonių prieš *P. betae*, tačiau anksčiau liga buvo kontroliuojama dirvožemio fumigacija cheminėmis medžiagomis - metilo bromidu arba dichloropropenu/dichloropropanu (Harveson ir Rush, 1994). Šiuo metodu buvo sėkmingai atsikratoma pernešėju, o cukraus išeiga padidinama nuo 1,3 iki 7,3 t/ha JAV ir nuo 2,1 iki 6,9 t/ha Prancūzijoje (Richard-Molard, 1984; Martin ir Whitney, 1990). Nepaisant metodo efektyvumo, naudoti šias chemines medžiagas buvo neekonomiška ir kenksminga aplinkai, todėl jų naudojimas buvo palaiapsniui nutraukiamas, remiantis Monrealio protokolu (United Nations Environment Programme (UNEP), 1987). Todėl reikėjo ieškoti alternatyvių rizomanijos kontrolės strategijų. Biologinė rizomanijos kontrolė buvo tirta taikant antagonistinius mikroorganizmus (tiek bakterinius, tiek grybinius preparatus), kurie kolonizuoja aukštesniųjų augalų šaknis, todėl gali apsaugoti cukrinius runkelius nuo patogeniško *P. betae*. Bakterinis sėklų apdorojimas, naudojant *Pseudomonas fluorescens* (Trev.) Mig., nepadėjo suvaldyti ligos, nors naudojant skirtingas *Trichoderma* Pers. ex Fries rūšis BNYVV kiekis buvo sumažintas 21-68 % (Resca ir kt., 2001; Jakubikova ir kt., 2006). Tačiau nepanašu, kad netolimoje ateityje šis metodas būtų priimtinas bendros rizomanijos kontrolės strategijoje.

Po pirminio viruso protrūkio žemyninėje Europoje tinkamų cheminių kontrolės priemonių trūkumas bei per lėtas ligos plitimo suvokimas paskatino imtis karantino priemonių, leisiančių išvengti tolesnio BNYVV paplitimo. Šios priemonės apėmė: a) importuojamos sodinamosios medžiagos ir dirvožemio kontrolę; b) tyrimus, siekiant nustatyti ligą; c) derliaus atskyrimą užterštose srityse; d) žemės ūkio įrangos, panaudotos dirbant su užsikrėtusiais augalais, izoliaciją; e) infekuotos derliaus dalies sunaikinimą; f) užkrėsto dirvožemio rotacijos kontrolę ir užterštų atliekų grąžinimo į neužkrėstas sritis išvengimą (Richard-Molard, 1985; Asher, 2002). Karantininė BNYVV kontrolė didžiąja dalimi buvo nesėkminga, nors labai sunku įvertinti, kas įtakojo kontrolę, turėjusią pristabdyti ligos plėtrą (Asher, 2002). Jungtinėje Karalystėje vykdytas matematinis modeliavimas, paremtas invazija ir ligos plitimu, parodė, kad yra sunku nusakyti šios infekcinės ligos paplitimą dar ir dėl to, kad plitimas vyksta ir besimptominiame etape (Stacey ir kt., 2004). Atsižvelgiant į tai, cukrinių runkelių pramonė vis labiau priklausė nuo alternatyvių rizomanijos valdymo strategijų, pirmiausiai naudojant atsparias cukrinių runkelių veisles (McGrann ir kt., 2009).

1.4.2.1. BNYVV atsparių cukrinių runkelių veislių paieška

Rizomanijai atsparių cukrinių runkelių veislių atranka prasidėjo 1970 m., tačiau tik daugiau kaip po 10 metų buvo sukurtos pirmosios atsparios veislės (Scholten ir Lange, 2000; Biancardi ir kt., 2002). Pirmieji cukrinių runkelių veislių atrankos bandymai buvo grindžiami simptomų skirtumų (lapų pageltimas arba raukšlėtumas, gyslų pageltimas ir/arba stiprus šaknų puvinimas derliaus nuėmimo metu auginant cukrinių runkelių veisles rizomanija užkrėstuose laukuose) atsiradimu (Fujisawa ir kt., 1982). Taip pat buvo tiriamas ir infekcijos poveikis šaknų derliui bei cukraus kiekiui. Veislėms su daliniu atsparumu rizomanijai buvo būdingas ne tik didesnis derlius ir cukraus kiekis, bet ir mažesnis natrio ir kalio kiekis (Bürcky, 1987).

Tiriant rizomaniją atsparumo ir tolerancijos terminai buvo naudojami apibūdinant tą patį reiškinį, bet dauguma autorių naudojo antrąjį terminą. Taip

vadinami tolerantiški genotipai turi mažesnę viruso kiekį šaknyse nei imlios kontrolinės veislės (Giunchedi ir kt., 1985, 1987; Bürcky ir Büttner, 1991). Vėliau buvo nuspręsta, kad atsparumo arba dalinio atsparumo terminas labiau tinkamas naudoti nei tolerantiškas (Van Geyt ir kt., 1990; Bürcky ir Büttner, 1991). Neigiama koreliacija tarp viruso koncentracijos visiškai subrendusio cukrinio runkelio šaknyse ir cukraus kiekio bei cukraus išeigos leido įvertinti viruso koncentraciją cukriniuose runkeliuose, kaip papildomą selekcijos kriterijų atsparių veislių kūrimui (Giunchedi ir kt., 1985, 1987).

Cukrinių runkelių veislės 'Dora' ir 'Lena' buvo išvestos kaip dalinai atsparios veislės (Bolz ir Koch, 1983; Hecht, 1989). Pirmoji veislė, rodanti didesnę atsparumą rizomanijai, buvo sukurta Italijoje ir vadinosi 'Rizor' (De Biaggi, 1987).

Vadinamas "Holly" atsparumas pirmą kartą buvo nustatytas 1983 metais cukrinių runkelių pasėliuose „Holly“ cukraus kompanijos Kalifornijoje, JAV (Lewellen ir kt., 1987). Buvo parodyta, kad šis atsparumas sąlygojamas vieno dominuojančio geno, pavadinto Rz1 (Lewellen ir kt., 1987; Pelsy ir Merdinoglu, 1996; Scholten ir kt., 1996). Ryškus dalinis atsparumas buvo nulemtas viruso dauginimosi slopinimu (Paul ir kt., 1992a). Rz1 šiandien yra vienas svarbiausių BNYVV atsparumo genų, tačiau jis nevienodai veikia visuose genetiniuose fonuose arba hibridinėse veislėse (Biancardi ir kt., 2002; Rush ir kt., 2006). Kadangi dominuojantis atsparumo genas Rz1 prarado atsparumą dėl atrankos, kurią cukriniai runkeliai patiria dėl patogenų populiacijos, buvo būtina ieškoti papildomų natūralių atsparumo genų (Rush ir kt., 2006).

Daug įvairių dalinio atsparumo BNYVV šaltinių buvo surasta *Beta vulgaris* var. *maritima* (L.) Arcang. (Lewellen, 1997). Monogeninis atsparumas, gautas iš laukinių runkelių (*angl.* wild beet, WB) WB42, atrodė veiksmingesnis nei "Holly" atsparumas ir, manoma, remiasi kitu mechanizmu (Paul ir kt., 1993b; Scholten ir kt., 1994; Whitney, 1989). O. E. Scholten ir kt. (1994 ir 1999) parodė, kad šį atsparumą sąlygojantis genas yra lokalizuotas

skirtingame III chromosomos lokuse tik keletą centiMorganų (cM) nuo Rz1. Jis buvo pavadintas Rz2.

Pirmosios BNYVV atsparios veislių kartos atrodė geriau negu imlios cukrinių runkelių veislės laukuose su žemu ar vidutiniu rizomanijos užkratu. Tokiuose laukuose, kuriuose nebuvo infekcijos, jų derlius buvo mažesnis nei imlių veislių. Vis dėl to, cukrinių runkelių augintojai greitai pagerino agronominį atsparių veislių panaudojimą. M. J. C. Asher ir kt. (2002) nustatė, kad smarkiai užkrėstuose laukuose atsparių veislių derlius buvo du/tris kartus didesnis nei imlių veislių; be to, laukuose, kur rizomanijos nebuvo, keletas atsparių veislių linijų rodė, kad cukraus išeiga panaši į imlioms veislėms būdingą išeigą.

Neseniai S. Gidner ir kt. (2005) nustatė papildomą atsparumo geną (Rz3) WB41. Rz3 taip pat yra cukrinių runkelių genomo III chromosomoje atskirai nuo Rz2. Negalima taip pat atmesti ir kitų nedidelių genų, esančių šalia Rz3, poveikio atsparumui galimybės. Be to, S. Gidner ir kt. (2005) nurodė mažesnę BNYVV kiekį iš dalies atspariuose cukriniuose runkeliuose, turinčiuose Rz1 ir Rz3 kombinaciją nei augalai, turintys tik Rz1.

Patobulinimai vyko ir toliau, buvo sukurtos veislės, turinčios Rz1 ir Rz2 bei rodančios daug mažesnę infekcijos lygį užkrėtus jas pažeidžiančiais atsparumą BNYVV izoliatais, negu veislės, turinčios tik Rz1 arba tik Rz2 (Liu ir Lewellen, 2007).

Nepaisant to, esant tokioms BNYVV virulentiškoms formoms, kaip P tipo ir pažeidžiantiems atsparumą izoliatams, yra būtini tolesni moksliniai tyrimai, siekiant nustatyti naujus atsparumo šaltinius, su kuriais galėtų dirbti cukrinių runkelių augintojai (Heijbroek ir kt., 1999; Liu ir kt., 2005). Manoma, kad JAV pasiklojimas atspariomis veislėmis, turinčiomis vieną atsparumo geną Rz1, paskatino naujų BNYVV izoliatų, pažeidžiančių atsparumą, atranką (Acosta-Leal ir kt., 2008). Jei ilgalaikių atsparumo šaltinių BNYVV nebus surasta, turėtų būti atrasti alternatyvūs viruso kontrolės būdai (McGrann ir kt., 2009).

1.4.2.2. Atsparumas viruso pernešėjui

Lygiagrečiai atsparumo BNYVV paieškai, dalis mokslininkų grupių pradėjo tirti atsparumo BNYVV pernešėjui *P. betae* galimybę. Nors didelis atsparumas *P. betae* kultivuojamuose runkeliuose nebuvo aptiktas, buvo nustatytas atsparumas kai kuriuose laukinio tipo *Procumbentes*, *Beta patellaris* (Moq.), *Beta procumbens* (C. Sm.) ir *Corollinae* atstovuose (Paul ir kt., 1992b, 1993a; Barr ir kt., 1995). Buvo pastebėta, kad *P. betae* zoosporos prikimba ir įsiskverbia į šių laukinių rūšių šaknis panašiu dažnumu kaip ir imliuose cukriniuose runkeliuose, tačiau *Plasmodiophoridae* retai toliau vystosi. Dėl to, daug mažiau *P. betae* ramybės būsenos sporų susidaro jų šaknyse. Kartu su daug mažesniu *P. betae* kiekiu šių rūšių šaknyse buvo mažesnis ir BNYVV kiekis (Paul ir kt., 1992b). Retos monosominės cukrinių runkelių linijos, *B. patellaris* ar *B. procumbens*, turinčios atskiras chromosomas buvo naudojamos siekiant įrodyti, kad genai, suteikiantys *P. betae* atsparumą, yra lokalizuoti IV ir VIII chromosomose abiejose laukinėse *Beta* rūšyse (Paul ir kt., 1992b; Mesbah ir kt., 1997). Virusų kiekiai taip pat buvo gerokai mažesni šiose pridėtinėse linijose. Tačiau dėl šių abiejų laukinių runkelių rūšių nesuderinamumo su cukriniu runkeliu gauti šios formos atsparumą įprastiniu metodu buvo neįmanoma (Van Geyt ir kt., 1990). Dalinis atsparumas buvo identifikuotas laukiniuose jūros runkeliuose *B. vulgaris* var. *maritima*, kurie lengvai kryžminasi su cukriniu runkeliu (Asher ir Barr, 1990).

Palikuonys, gauti sukryžminus *P. betae* atsparius jūros runkelius ir imlius cukrinius runkelius, pasižymėjo atsparumu pernešėjui, kurie taip pat sumažino BNYVV šaknyse. Palikuonių populiacijos molekulinė analizė padėjo nustatyti du sąveikaujančius kiekybinius lokusus, susijusius su atsparumu *P. betae* ir esančius IV ir IX chromosomose (Asher ir kt., 2009). Atsparumas pernešėjui kartu su Rz1 sąlygojamu atsparumu virusui mažina BNYVV kiekį užkrėstų augalų šaknyse. Šis atsparumo pernešėjui ir virusui derinys teikia naujų perspektyvių galimybių cukrinių runkelių augintojams, siekiant padidinti atsparumą rizomanijai ir ilgaamžiškumą (McGrann ir kt., 2009).

1.4.2.3. Transgeninis atsparumas

Alternatyvus rizomanijos kontrolės būdas yra transgenų, gautų iš patogenų, panaudojimas. Pradiniai transgeninių cukrinių runkelių, ekspresuojančių BNYVV CP seką, tyrimai parodė, kad šie augalai pasižymėjo sumažintu viruso kiekiu tiek šiltnamio, tiek ir lauko bandymuose (Mannerlöf ir kt., 1996). L. F. Fecker ir kt. (1997) tyrė antikūnų trumposios grandinės fragmentus (scFv), kurie buvo specifiški BNYVV CP *N. benthamiana* augaluose, ir nustatė, kad transgeniniai augalai pasižymi daliniu atsparumu virusui. Augalai, ekspresuojantys BNYVV CP specifinį scFv, sulėtino aptinkamo BNYVV kaupimąsi lapuose tiek po mechaninio užkrėtimo, tiek po virulentinės *P. betae* inokuliacijos. Tačiau vėliau infekcijos cikle viruso titras pasiekė panašų lygį kaip ir eksperimentuose su netransgeniniais kontroliniais augalais. I. B. Andika ir kt. (2005) *N. benthamiana* ekspresavo BNYVV CP ištinio skaitymo domeno ORF ir parodė, kad transgeniniai augalai pasižymi labai žemu viruso kiekiu po inokuliacijos su virulentiniu *P. betae*. Šis atsparumas buvo nulemtas RNR nutildymo mechanizmu. B. L. Lennefors ir kt. (2006) transformavo cukrinius runkelius su invertuotais 0,4 kb kDNR pasikartojimais, gautais iš BNYVV replikazės geno. Augalai, ekspresuojantys BNYVV dvRNR, parodė šaknyse virusą, kurio kiekis buvo mažesnis arba lygus viruso kiekiui, nustatomam atspariuose kontroliniuose augaluose, kurie buvo užkrėsti BNYVV B tipu tiek šiltnamyje, tiek ir lauko eksperimentuose. Panašūs atsparumo eksperimentai buvo atlikti su BNYVV A tipu. Tuo tarpu tyrimai su viruso P tipu parodė, kad transgeniniai augalai pasižymėjo gerokai mažesniais viruso kiekiais nei cukriniai runkeliai, turintys stipriausią įprasto atsparumo (C48 × Holly) kombinaciją. Atsparus fenotipas, gautas B. L. Lennefors ir kt. (2006), taip pat veikė per RNR nutildymą, o jo stipresnis fenotipas, palyginus su I. B. Andika ir kt. (2005) gautu fenotipu, galėjo būti gautas panaudojus replikazės geną, sukeltantį nutildymą vietoj CP ištinio skaitymo geno. Pastarasis yra laikomas "silpnu nutildymo induktoriumi". BNYVV transgeniniuose augaluose, ekspresuojančiuose dvRNR-suteiktą

atsparumą, išlieka mažai mišrių infekcijų metu, kai cukriniai runkeliai natūraliai užsikrečia kitais virusais jau esant BNYVV infekcijai. Kai kurie iš šių virusų turi stiprius RNR nutildymo inhibitorius. Vienas jų – runkelių geltos viruso (*Beet yellows virus*, BYV) baltymas P21 (Reed ir kt., 2003). Tačiau dar nei viena iš mišrių infekcijų neįveikė transgeninio atsparumo. Tai rodo, kad laukuose atsparumas gali būti ilgalaikis (Lennefors ir kt., 2008).

Naudoti transgenus, galinčius suteikti atsparumą prieš dirvožemyje plintančius virusų pernešėjus *Polymyxa*, taip pat yra patraukli galimybė. Yra vykdomi moksliniai tyrimai siekiant nustatyti genus kandidatus, kurie, ekspresuojami augaluose šeimininkuose ir augaluose ne šeimininkuose, vykstant sąveikai su *Polymyxa* rūšimis, gali būti panaudojami transgeninėse strategijose, siekiant išvengti šių parazitų įsiskverbimo į jų šeimininkus virusų pernešimo metu (McGrann ir kt., 2007, 2008). Transgeninė rizomanijos kontrolė yra patraukli alternatyva įprastai išvestoms cukrinių runkelių veislėms, ypač tose srityse, kur yra didelis ligos paplitimas arba kur egzistuoja labai virulentiškos viruso formos (McGrann ir kt., 2009).

1.4.3. Sąveika su kitais dirvožemiu plintančiais virusais

Rizomanija yra tik viena iš daugelio virusinių ligų, kurios paveikia cukrinius runkelius, todėl egzistuoja sąveikos tarp skirtingų virusų galimybė. *P. betae* yra ne tik BNYVV, bet taip pat ir runkelių dirva pernešamo viruso (*Beet soil-borne virus*, BSBV), runkelių dirva pernešamo mozaikos viruso (*Beet soil-borne mosaic virus*, BSBMV), runkelių ažuolo-lapo viruso (*Beet oak-leaf virus*, BOLV) bei runkelių viruso Q (*Beet virus Q*, BVQ) pernešėjas. Šie virusai dažnai tame pačiame augale sukelia mišrią infekciją (Prillwitz ir Schlösser, 1993; Heidel ir Rush, 1994; Meunier ir kt., 2003b; Liu ir Lewellen, 2008). Pirmieji sąveikos įrodymai buvo pateikti H. Prillwitz ir E. Schlösser (1993). Jie nustatė, kad cukriniai runkeliai, kurie pradžioje buvo užkrėsti BSBV, gerokai mažiau nukentėjo nuo vėlesnės BNYVV infekcijos, lyginant su augalais, kurie buvo užkrėsti tik BNYVV. Panašūs bandymai, dirbtinai užkrečiant cukrinių runkelių augalų lapus BNYVV ir BSBMV parodė, kad

ankstesnė inokuliacija su vienu iš virusų, suteikia tam tikrą apsaugą nuo vėlesnės kitų virusų infekcijos (Mahmood ir Rush, 1999). Šiuose „apsaugotuose“ augaluose buvo nustatyta abiejų virusų RNR, tačiau vėlesnės infekcijos viruso apvalkalo baltymas nebuvo nustatytas. Tai rodo, kad kryžminė apsauga veiksmingai nuslopino antro viruso replikaciją (Mahmood ir Rush, 1999). Cukrinių runkelių tyrimai, atlikti naudojant natūralų BNYVV ir BSBMV užkratą, pernešamą *P. betae*, parodė, kad BSBMV kiekis augaluose visada buvo mažesnis dviguboje infekcijoje su BNYVV (Wisler ir kt., 2003). Šis reiškinys taip pat buvo pastebėtas BNYVV atspariuose genotipuose, kuriuose BNYVV kiekiai buvo nedideli. Taigi, bendra BSBMV ir BNYVV infekcija sukelia BSBMV slopinimą. Visai neseniai, H. Y. Liu ir R. T. Lewellen (2008) paskelbė, kad mišrioje BNYVV ir BOLV infekcijoje, BNYVV kiekiai buvo žymiai mažesni dviguboje infekcijoje tiek BNYVV imliose, tiek ir BNYVV atspariose runkelių veislėse, palyginus su kiekiu, gautu, kai BNYVV veikė vienas. Šie duomenys rodo, kad BOLV gali slopinti BNYVV infekciją. BNYVV taip pat buvo nustatytas mišrioje infekcijoje kartu su dirvožemiu plintančiu runkelių juodosios degligės virusu (*Beet black scorch virus*, BBSV), kurio *P. betae* neperneša. Jis yra pernešamas *Olpidium brassicae*, priklausančiam *Chytridiales*. Sąveikos tarp šių virusų vaidmuo yra neaiškus. Nėra žinoma, ar BBSV prisideda prie rizomanijos ligos vystymosi (Koenig ir Valizadeh, 2008). Taigi, reikalingi nuodugnesni tyrimai siekiant suprasti šių sąveikų molekulinis pagrindus bei nustatyti, ar kiti dirvožemiu plintantys virusai turi potencialų vaidmenį kontroliuojant BNYVV.

Rizomanija užkrėsti augalai dažnai būna užsikrėtę ir "virusine gelta" (*angl.* virus yellows) – liga, kurią sukelia kompleksas, sudarytas iš keturių, amarais platinamų (*Polerovirus* ir *Closterovirus* genčių) virusų (Stevens ir kt., 2005a). Nors pradžioje juos cukriniams runkeliams perduoda jų pernešėjai amarai, šie virusai gali būti pernešti per floemą į šaknies audinius, kur jie jau gali sąveikauti su BNYVV. Mišrios BNYVV ir runkelių silpnojo pageltimo poleroviruso (*Beet mild yellowing virus*, BMYV) infekcijos derlių gali sumažinti apie 83 % (Stevens ir Asher, 2005). Tačiau ypatingo susidomėjimo

sulaukė preliminarūs bandymai, atlikti šiltnamio sąlygomis. Nustatyta, kad cukrinių runkelių veislės, turinčios Rz1 geną, atsakingą už atsparumą rizomanijai, turėjo didesnę BNYVV kiekį mišrios infekcijos su BMVYV metu (M. Stevens, neskelbti duomenys, Broom's Barn tyrimų centras, Bury St Edmunds). Galimam synergizmui tarp BNYVV ir BMVYV įvertinti bei nustatyti, kur ir kaip virusai sąveikauja, reikia tolesnių tyrimų. Tai ypač intriguojanti situacija, atsižvelgiant į skirtingų virusų tariamą kompartmentalizaciją. BNYVV daugiausia, bet ne išimtinai, lokalizuojasi ksilemos induose, tuo tarpu polerovirusai pirmiausia yra lokalizuoti floemoje ir kaimyninėse ląstelėse (Kaufmann ir kt., 1992; Stevens ir kt., 2005a). Ankstesni darbai parodė, kad invazija į nefloeminius audinius bulvių lapų susisukimo viruso (*Potato leafroll virus*, PLRV), kuris yra glaudžiai susijęs su BMVYV, yra intensyvesnė augaluose, užkrėstuose bulvių virusu Y (*Potato virus Y*, PVY) (Barker, 1987). Panašus reiškinys gali egzistuoti cukriniuose runkeliuose dvigubos infekcijos metu tarp amarais ir *Plasmodiophoridae* pernešamų virusų. Taigi, tyrimai, ar ši synergistinė sąveika turi neigiamą poveikį cukrinių runkelių atsparumui BNYVV laukuose, yra svarbūs kuriant ateities kontrolės priemones prieš cukrinių runkelių virusines ligas (McGrann ir kt., 2009).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Tiriamieji simptomatiniai augalai

Tyrimams buvo atrenkami cukrinių runkelių mėginiai pagal būdingus rizomanijai simptomus įvairiose Lietuvos, Ukrainos ir Kazachstano vietovėse. Kadangi dažniausiai BNYVV yra aptinkamas cukrinių runkelių šaknyse, dažniau buvo imamos cukrinių runkelių šaknys nei lapai. Surinkti augalų mėginiai buvo dedami į polietilenuis maišelius su sudrėkintu filtriniu popieriumi ir gabenami į laboratoriją tolesniems tyrimams. Laboratorijoje augaliniai mėginiai buvo užregistruojami: užrašoma mėginio numeris, surinkimo data ir vietovė bei užšaldomi -20° C temperatūroje. Informacija apie surinktų mėginių radavietės pateikiama 2.1. lentelėje.

2.1. lentelė. Tyrimams surinkti simptomatiniai augalai ir jų radavietės.

Radavietė	Paimtų mėginių skaičius
Lietuva	
Panevėžio raj., Ėriškių km.	5
Kauno raj., ūkininko Stankio laukas	62
Kauno raj., Babtų apylinkė, ūkininko Svičiulio laukas	2
Kauno raj., Babtų seniūnija	2
Kauno raj., ūkininko Koženiausko laukas	2
Kauno raj., prie Panevėžiuko	2
Šakių raj., Tupikų km.	2
Šakių raj., Griškabūdis	6
Šakių raj., Sintautų km.	2
Vilkaviškio raj., Rumokų bandymų stotis	3
Vilkaviškio raj., Serdokų km.	2
Marijampolės raj. prie Marijampolės miesto	4
Marijampolės raj., Brukų km.	2
Kėdainių raj., Krekenava	2
Kėdainių raj., Josvainiai	2
Kėdainių raj., ūkininko Lukošiaus laukas	2

Ukraina	
Radzyvylivskij raj., Rivnenska sritis, Krupec	9
Brody, Lvivska sritis	2
Radechivskij raj., Lvivska sritis, Chmilno	2
Radechivskij raj., Lvivska sritis, Babyči	4
Kamjanka-Buzkij raj., Lvivska sritis, Kamjanka-Buzka	3
Buzkij raj., Lvivska sritis, Ožydiv	4
Zoločivskij raj., Lvivska sritis, Pidgirci	3
Zoločivskij raj., Lvivska sritis, Strutyn	3
Čortkivskij raj., Ternopilska sritis, Oryškievi km.	3
Zalicšickij raj., Ternopilska sritis, Torske	2
Gorodenkivskij raj., Ivano-Frankivska sritis, Jaseniv-Pilnij km.	3
Kicmanskij raj., Černivecka sritis, Berehomet	2
Novoselyckij raj., Černivecka sritis., Bojany km.	2
Chmelnycka sritis, Starokostjantyniv	4
Starokostjantynivskij raj., Chmelnycka sritis, Ladygy	5
Chmilnyckij raj., Vinnycka sritis, Andrijašivka km.	2
Ružynskij raj., Žytomyrska sritis, Ružyn	4
Kazachstanas	
Talgarskij raj., privati kompanija „Nura“	2
Kazachstano Žemdirbystės Institutas	1
Taran km.	1
Ilijskij raj., Kojan-Koz km.	1
Džanbulskij raj., privati kompanija „Rauryk Batyr“	1
Ilijskij raj., privati kompanija „Čapajeva“	1

2.1.2. Reagentai ir rinkiniai

Reagentai:

β -merkaptioetanolis (ME), BSA	<i>Serva</i>
Amonio persulfatas (APS); Bisakrilamidas (N,N'-metilen-bis-akrilamidas); kiaušinio albuminas; Na ₂ CO ₃ ; NaHCO ₃ ; PVP (polivinilpirolidonas); TRIS (2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis); NaBH ₄ ; glicerolis; NDS (natrio dodecil sulfatas); MgCl ₂ ; PVDF (polivinilidenfluorido) membranos; natrio acetatas; metanolis; izoproponolis	<i>Roth</i>
DIECA (natrio dietilditiokarbamatas); EDTA (etilendiamintetraacetatas); KH ₂ PO ₄ ; KCl; Na ₂ HPO ₄ ; NaH ₂ PO ₄ ; NaN ₃ ; Tween 20; UA (uranilacetatas); HCl; dietanolaminas	<i>Merck</i>

(NH(CH ₂ CH ₂ OH) ₂ ; Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O; amonio sulfatas; PEG 600; chloroformas	
RNazių inhibitorius, DNR restriktazių „Tango“ buferis; PCR buferiniai tirpalai: 10 mM dNTP mišinys, 10×Taq buferis, 25 mM MgCl ₂ ; TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidino) ONE (ready-to-use) substratas (IFA) testui; agarozė; DTT (ditiotreitolis)	<i>MBI Fermentas</i>
Etanolis	<i>AB Sema</i>
Etidžio bromidas (EtBr)	<i>Boehringer Mannheim GmbH</i>
H ₂ SO ₄ ; NaCl; agarozė; CCl ₄	<i>Lachema</i>
Na ₂ SO ₃ ; TMB skystas substratas (Imunoblotui); BCIP/NBT (bromochloroindolilfosfato/nitromeliotetrazolio) skystas substratas (Imunoblotui); Antriniai triušio ak, gauti iš ožkos, konjuguoti su šarmine fosfotaze; Freund'o pilnas adjuvantas; Freund'o nepilnas adjuvantas; Na ₂ B ₄ O ₇ ; želatina; boro rūgštis	<i>Sigma</i>
Skystas azotas	<i>ELME- Messer</i>
TEMED (N,N,N',N'- tetrametiletilendiaminas)	<i>Reanal</i>
p-nitrofenilfosfatas – substratas (IFA) testui	<i>Fisher chemicals</i>
NaIO ₄	<i>Aldrich</i>
Antriniai triušio ak, gauti iš ožkos, konjuguoti su krienų peroksidaze; pieno milteliai	<i>Bio-Rad</i>
Sacharozė; natrio šarmas; acto rūgštis	<i>Peaxim</i>

Rinkiniai:

DNR gryninimui iš agarozės gelio: “DNA extraction kit”	<i>MBI Fermentas</i>
IFA testams: BNYVV DAS-ELISA ir BSBV TAS-ELISA	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ</i>
IFA BNYVV lauko testams Spot-check LF TM	<i>Strube-Dieckmann GmbH</i>
Augalų virusų RNR išskyrimui:	
“QuickPrep total RNA extraction kit for the direct isolation of total RNA from most eukaryotic tissues or cells”	<i>Amersham Bioscience</i>
„TRIzol Reagent“	<i>Invitrogen</i>

2.1.3. Fermentai

HRP (krienu peroksidazė)	<i>Merck</i>
M-MuLV AT (Moloney pelių leukemijos viruso atvirkštinė transkriptazė),	<i>MBI Fermentas</i>
Rekombinantinė Taq polimerazė	
DNR restriktazės: <i>TaqI, HincII, AccI, BstUI</i>	

2.1.4. Molekulinės masės standartai ir dažai

DNR fragmentų standartai ir dažas:	
Φ×174 DNA /BsuRI(Hae III), fragmentų dydžiai: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp	<i>MBI Fermentas</i>
GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, fragmentų dydžiai: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 100, 50 bp	
GeneRuler™ 100 bp Plus, fragmentų dydžiai: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp	
PCR produkto dažas “6× Loading Dye”	
Baltymų molekulinės masės standartai ir dažas:	
PageRuler™ Prestained protein Ladder, fragmentų dydžiai: 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 11 kDa	<i>MBI Fermentas</i>
Gelio baltymų dažas PageBlue™	

2.1.5. Oligonukleotidiniai pradmenys

Pradmuo	Seka 5' - 3'	Tipas	PCR produktas, bp
BNYVV CP geno identifikacijai (<i>MBI Fermentas</i>)	CGATTGGTATGAGTGATTT(A)	Ties.	500
	ACTCGGCATACTATTCCT(T)	Atv.	
BNYVV CP geno nPCR (<i>Metabion</i>)	ATAGAGCTGTTAGAGTCACC	Ties.	326
	GACGAAAGAGCAGCCATAGC	Atv.	
BNYVV CP geno padauginimui (<i>Metabion</i>)	ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATG	Ties.	567
	ATTGTCCGGGTGGACTGGTTC	Atv.	
BNYVV p25 geno padauginimui (<i>Metabion</i>)	GTTGTTGTGTTTTCTGATCATCATT	Ties.	719
	GTGTTGTTGAAATTGTGATAACTC	Atv.	

BNYVV RFLP analizei (Metabion)	ATGGTCCAAGTACAGC	Ties.	1160
	TAGACATTATCTATC	Atv.	
BNYVV TGB geno padauginimui (Metabion)	ACCGGAGATACTTTTTGCG	Ties.	722
	AACAAAAACACCGCCAAACC	Atv.	
BNYVV B tipo nustatymui (Metabion)	TAATAGTATCACTGTTACAACGATTAAGA	Ties.	324
	GTCACCTCTTTTTACCATTATATCAG	Atv.	
BNYVV A tipo nustatymui (Metabion)	TTGGGCAGCAACTTA	Ties.	178
	ACGGTGAGTACAACATACTGA	Atv.	
BNYVV detekcijai (Metabion)	ACATTTCTATCCTCCTCCAC	Ties.	545
	ACCCCAACAAACTCTCTAAC	Atv.	
BSBV detekcijai (Metabion)	CTTACGCTGTTCACTTTTATGCC	Ties.	399
	GTCCGCACTCTTTTCAACTGTTC	Atv.	
BVQ detekcijai (Metabion)	GCTGGAGTATATCACCGATGAC	Ties.	291
	AAAATCTCGGATAGCATCCAAC	Atv.	

2.1.6. Buferiai ir tirpalai

Buferiniai tirpalai:	
1. Imunofermentinės analizės (IFA) tirpalai:	
Padengimo buferis (pH 9,6)	1 L reikia: 1,59 g Na ₂ CO ₃ ; 2,93 g NaHCO ₃ ; 0,2 g NaN ₃
Fosfatinis buferis (PBS) (pH 7,2-7,4)	1 L reikia: 8,0 g NaCl; 0,2 g KH ₂ PO ₄ ; 1,15 g Na ₂ HPO ₄ ; 0,2 g KCL; (0,2 g NaN ₃)
Praplovimo buferis (PBS-T)	PBS su 0,05-0,1 % Tween-20
Mėginio ekstrakcijos buferis (pH 7,4)	PBST su 2 % PVP
Konjugacijos buferis	PBST su 2 % PVP ir 0,2 % kiaušinio albumino arba BSA
Substrato buferis (p-Nitrofenilfosfatui) (pH 9,8)	1 L reikia: 97 ml dietanolamino; 600 ml H ₂ O; 0,2 g NaN ₃

Imobilizacijos buferis (pH 9,5)	0,05 M NaHCO ₃
Blokavimo tirpalas	PBS su 1 % albumino
TMB stabdymo tirpalas	3,6 % H ₂ SO ₄
2. Imunobloto tirpalai:	
Baltymų pernešimo buferis	25 mM Tris bazinio; 192 mM glicino; 20 % metanolio; (0,1 % NDS)
PBS (pH 7,2-7,4)	0,05 M KH ₂ PO ₄ ; 0,05 M Na ₂ HPO ₄ ; 0,15 M NaCl
Plovimo tirpalas I (PBS-T)	PBS su 0,1 % Tween-20
Plovimo tirpalas II (TBS-T)	10 mM Tris HCl; 50 mM NaCl (pH 7,5); 0,1 % Tween 20
Blokavimo tirpalas	PBS su 1 % želatinos
Inkubavimo/blokavimo tirpalas	10 mM TRIS-HCl; 50 mM NaCl (pH 7,5); 5 % neriebaus pieno milteliai; 0,05 % Tween 20
Substrato buferis	100 mM TRIS bazinio; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂ (pH 9,5)
3. DNR elektroforezės tirpalai ir geliai:	
10×TBE buferis	0,89 M TRIS; 0,89 M boro rūgštis; 0,02 M EDTA (pH 8,2-8,3)
10×TAE buferis	0,4 M TRIS; 0,2 M acto rūgštis; 0,01 M EDTA (pH 8,4)
Etidziobromido tirpalas	10 mg/ml etidziobromido
DNR geliai:	
5 % poliakrilamidinis gelis	18 ml dejonizuoto vandens; 2,5 ml 10×TBE buferio; 4,5 ml (29:1) bisakrilamido; 15,6 μl TEMED; 310 μl 10 % APS
1-2 % agarozinis gelis	1-2 % agarozės TAE buferiniame tirpale
4. Tirpalai baltymų elektroforezės poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis	
Akrilamido/bisakrilamido tirpalas	30 % akrilamido; 0,8 % bisakrilamido
1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8)	500 ml tirpalo reikia: 91 g TRIS; 300 ml bidistiliuoto vandens. Su 1N HCl nustatoma tirpalo pH ir pripilama vandens iki 500 ml (saugoti 4° C)
0,5 M TRIS-HCl (pH 6,8)	200 ml tirpalo reikia: 12,1 g TRIS; 100 ml bidistiliuoto vandens. Su 1N HCl nustatoma tirpalo pH ir pripilama vandens iki 200 ml (saugoti 4° C)
10 % NDS tirpalas	5 g NDS tirpinamas vandenyje ir skiedžiamas iki 50 ml. Tirpalas laikomas kambario temperatūroje

10 % amonio persulfatas (APS)	10g APS tirpinti 10 ml vandenyje, išpilstyti į ependorfinius mėgintuvėlius (saugot -20° C)
Elektroforezės buferis (pH 8,3)	25 mM TRIS-HCl; 200 mM glicino; 0,1% NDS
4×mėginio buferis	65 mM TRIS-HCl (pH 6,8); 0,1% NDS; 0,2 % 2-MET (merkaptio etanolio) arba 10 mM DTT (ditiotreitolio); 0,1% bromfenolio mėlio; 20 % glicerolio (saugoti -20° C)
Gelio fiksavimo tirpalas	50 % etanolio; 10 % acto rūgšties; 0,1 % Coomassie dažo R-250
Gelio atplovimo tirpalas	10 % acto rūgštis
Baltymų gelis:	
4 % koncentruojamasis gelis	0,67 ml Akiril/Bis, 1,25 ml TRIS-HCl (pH 6,8), 50 µl 10 % NDS, 3 ml H ₂ O; 25 µl 10 % APS; 5 µl TEMED
10 % skiriamasis gelis	3,3 ml Akiril/Bis, 2,5 M TRIS-HCl (pH 8,8), 100 µl 10 % NDS, 3,83 ml H ₂ O, 50 µl 10 % APS; 5 µl TEMED
12 % skiriamasis gelis	4 ml Akiril/Bis, 2,5 M TRIS-HCl (pH 8,8), 100 µl 10 % NDS, 3,17 ml H ₂ O, 50 µl 10 % APS; 5 µl TEMED
5. BNYVV inokuliacijos buferis	0,05 M KH ₂ PO ₄ , 0,05 M Na ₂ HPO ₄ , 0,3 % DIECA, 0,2 % Na ₂ SO ₃ (pH 7,2)
6. BNYVV gryninimo ir valymo tirpai	
Ekstrakcijos buferis (pH 9,0)	0,1 M Na ₂ B ₄ O ₇ . (pH priversti su boro rūgštimi)
Sacharozės tirpalai	5, 20, 45 % sacharozė 10 mM ekstrakcijos buferyje
7. Elektroninės mikroskopijos (EM) kontrastuojantis tirpalas	2 % uranilacetato (UA) tirpalas bidistiliuotame vandenyje
8. Antikūnų konjugavimo su peroksidaze tirpalai	
0,2 M NaIO ₄	42,8 mg/ml NaIO ₄ . Reikia 0,5-1 ml, paruošti prieš naudojimą
1 mM natrio acetatinis buferis (pH 4,5)	82,03 mg/l, reikia 100-200 ml
0,2 M natrio karbonatinis buferis (pH 9,5)	Gaminant 100 ml reikės: 2,12 g Na ₂ CO ₃ ; 1,68 g NaHCO ₃
0,01 M natrio karbonatinis buferis (pH 9,5)	0,2 M natrio karbonatinį buferį (pH 9,5) skiesti 20 kartu
Natrio borhidrido tirpalas	4 mg/ml NaBO ₄ . Reikia 0,5-1 ml, paruošti prieš naudojimą
PBS (pH 7,2-7,4)	0,05 M KH ₂ PO ₄ ; 0,05 M Na ₂ HPO ₄ ; 0,15 M NaCl

2.2. Metodai

2.2.1. Augalinės infekuotos medžiagos sukaupimas, augalų indikatorių metodas

BNYVV mechaniškai buvo užkrečiami tiriamieji indikatoriniai augalai bei augalai, pripažinti BNYVV diagnostinėmis rūšimis: *Cucumis sativus* L., *Nicotiana glutinosa* L., *N. debneyi* Domin, *N. benthamiana* Domin, *N. rustica* L., *N. tabacum* L. cv. 'Samsun', *Phaseolus vulgaris* L., *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn, *C. quinoa* Willd, *Tetragonia expansa* Murr, *Atriplex hortensis* L., *Celosia cristata* (L.) Kuntze, *Spinacia oleracea* L.

BNYVV sukaupimui, padauginimui bei saugojimui buvo pasirinkti *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *T. expansa* indikatoriniai augalai, kurie reagavo į virusą tik vietinėmis pažaidomis (Andika ir kt., 2005; Tamada ir kt., 1989). Indikatoriniai augalai yra mechaniškai užkrečiami virusu infekuotų augalų sultimis iš šviežios, šaldytos arba liofilizuotos medžiagos. Porcelianiniame grūstuvėlyje inokuliuoto buferiniame tirpale sutrinama virusu infekuota augalinė medžiaga. Poroloninė kempinėle sumirkoma paruoštame inokuliume. Ja švelniai įtrinamas indikatorinio augalo lapų paviršius, prieš tai juos pabarsčius karborundu kaip abrazyvine medžiaga. Užkrečiami jauni augalai, 3-5 lapų stadijoje. Vietinės chlorotinės arba pusiau nekrotinės pažaidos (dėmės) arba pageltimai susidaro ant indikatorinių augalų maždaug po 3-7 d., priklausomai nuo temperatūros. Jei yra sisteminė infekcija, simptomai pasirodo praėjus savaitei ar daugiau po inokuliacijos. Esant tik vietinėms pažaidoms, maksimalus viruso kiekis susikaupia per 4-7 dienas. Praėjus šiam laikotarpiui lapai su aiškiai pastebimais simptomais yra surenkami, sveriami, fasuojami, žymimi ir padedami saugoti minusinėje temperatūroje arba liofilizuojami, t.y. užlydomi vakuumuotose stiklinėse ampulėse.

2.2.2. BNYVV gryninimas ir koncentravimas

BNYVV gryninimui, remiantis literatūros šaltiniais, buvo pasirinktas *C. quinoa* indikatorinis augalas. Gryninimo eiga vykdoma pagal šiek tiek modifikuotą S. E. Bouzoubaa (1998) metodiką:

1. Infekuoti BNYVV lapai pasveriami ir homogenizuojami homogenizatoriuje (Mechanika Precyzyjna Type 302) su 170 ml šaltu ekstrakcijos buferiu (0,1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 9,0) ir 100 ml šaltu CCl_4 tirpalu/100 g lapų.
2. Homogenizatas perpilamas į centrifuginius mėgintuvėlius, kurie centrifuguojami 9000 rpm (~10 000 g) 30 min. 4° C (Janetzki K-24 centrifugoje).
3. Į supernatantą pridedama 2 % PEG 6000 ir 0,8 % NaCl. Magnetine maišykle maišoma 2 val. 4° C temperatūroje.
4. Virusas nusodinamas centrifuguojant 15 000 rpm 20 min. 4° C.
5. Gautos nuosėdos suspenduojamos 100 ml 10 mM ekstrakcijos buferyje ir laikomos 4° C temperatūroje per naktį. (Supernatantas neišpilamas ir taip pat saugomas per naktį 4° C).
6. Kitą dieną virusų suspensija (suspenduotos nuosėdos) nuskaidrinama 5000 rpm 20 min. 4° C.
7. Apjungus abu supernatantus į virusinę suspensiją pakartotinai pridedama 2 % PEG 6000 ir 0,8 % NaCl. Magnetine maišykle maišoma 2 val. 4° C temperatūroje.
8. Virusas nusodinamas centrifuguojant 12 000 rpm 20 min. 4° C. Nuosėdos suspenduojamos 30 ml 10 mM ekstrakcijos buferyje ir laikoma per naktį 4° C temperatūroje.
9. Virusų suspensija vėl nuskaidrinama 10 min. centrifuguojant 5000 rpm 4° C, gautas supernatantas saugomas.
10. 10 mM ekstrakcijos buferyje atskiestas iki 27 ml virusinis preparatas centrifuguojamas jį užnešant ant 7 ml 20 % sacharozės „pagalvės“ 3,5 val. 22 000 rpm 4° C Janetzki VAC 601 ultracentrifugoje.
11. Gautos nuosėdos suspenduojamos 500 μl 10 mM ekstrakcijos buferyje, paliekant per naktį 4° C temperatūroje.
12. Virusų kiekis įvertinamas spektrofotometriškai. Prieš viruso absorbcijos spektro matavimą, virusų suspensija nuskaidrinama 4 min. 10 000 aps./min. Dalis supernatanto atskiedžiamas 10 kartų, paimamas

pavyzdys EM ir matuojamas viruso absorbcijos spektras 240, 260 ir 280 nm bangos ilgiuose. Fiksuojami rezultatai. Virusų koncentracija nustatoma pagal formulę: $C \text{ (mg/ml)} = OD_{260} \times \text{skiedimas}/3,2$;

kur skaičius 3,2 yra viruso ekstinkcijos koeficientas (Putz ir Kuszala, 1978; Bouzoubaa, 1998).

Gauta viruso suspensija gali būti saugoma kelias dienas 4° C arba užšaldoma -20° C kelioms mėnesiams (pridėjus glicerolio).

13. Norint geriau išgryninti virusą (antiserumo gavimui), naudojamas 4-45 % sacharozės gradientas centrifuguojant Janetzki VAC 601 ultracentrifugoje. Virusų dalelės koncentruojasi tam tikroje gradiento zonoje. Ši frakcija yra surenkama ir virusas nusodinamas, centrifuguojant 3,5 val. 22 000 rpm 4° C. Nuosėdos suspenduojamos mažame tūryje 10 mM ekstrakcijos buferyje. Pridėjus NaN₃ virusinis preparatas saugomas 4° C temperatūroje arba pridėjus glicerolio užšaldomas -20° C.

2.2.3. Elektroninė mikroskopija (EM)

Tiriamą mėginį paruošimo eiga:

1. Ant specialaus elektroninio mikroskopo tinklelio, padengto anglies plėvele, užnešamas lašas mėginio (sutrinta tiriamoji augalinė medžiaga su 0,05 M fosfatinu buferiu pH 7,4; arba išgryninta virusų suspensija), inkubuojama 5 minutes.
2. Skystis nuo šio tinklelio nugariamas filtriniu popieriumi, ant tinklelio yra užnešamas kontrastavimo tirpalas – 2 % UA lašas. Po kelių min. tinklelį nusausinus, UA lašas užnešamas pakartotinai.
3. Tinklelis nudžiovinamas ir mėginiai stebimi peršviečiamuoju elektroniniu mikroskopu JEOL JEM-100S.

2.2.3.1. Imunosorbentinė elektroninė mikroskopija (IEM)

Tiriamos mėginio paruošimo eiga:

1. Tinkleliai sensibilizuojami 1 val., užnešus ak, skiestus 1:100 0,05 M fosfatiniame buferyje pH 7,4.
2. Tinklelis keletą kartų praplaunamas su 0,05 M fosfatinu buferiu pH 7,4.
3. Užnešamas tiriamas mėginys.
4. Skystis nuo šio tinklelio nugariamas filtriniu popieriumi, ant tinklelio yra užnešamas kontrastavimo tirpalas – 2 % UA lašas. Po kelių min. tinklelį nusausinus, UA lašas užnešamas pakartotinai.
5. Tinklelis nudžiovinamas ir mėginiai stebimi peršviečiamuoju elektroniniu mikroskopu JEOL JEM-100S.

2.2.4. BNYVV polikloninių antikūnų paruošimas

2.2.4.1. Antiserumo gavimas

1. Triušio imunizacija. Polikloninių antikūnų gavimui triušis imunizuojamas išgrynintu virusiniu preparatu, kuriame yra 0,2–1mg virusinio antigeno (ag). Jis sumaišomas santykiu 1:1 su Freund'o adjuvantu ar fiziologiniu tirpalu, priklausomai nuo to, kur bus leidžiamas virusinis antigenas.
 - a. *Pirmasis imunizavimas.* Išgryninta virusinė suspensija (0,34 mg viruso) sumaišoma su pilnu Freund'o adjuvantu. Švirkštu emulguotas mišinys suleidžiamas triušiui nugaros keteros srityje į odą ir poodį, paskirsčius visą imunizacijos tūrį į 10-12 suleidimo vietų (po 50-100 µl).
 - b. *Antrasis imunizavimas* (trys savaitės po pirmojo imunizavimo). Vienkartiniu švirkštu emulguotas nepilnas Freund'o adjuvanto mišinys su 0,2 mg viruso suspensijos suleidžiamas į užpakalinės triušio kojos raumenis (4 suleidimo vietas).

c. *Trečiasis imunizavimas* (savaitė po antrojo imunizavimo).

Virusinis preparatas (0,05 mg) sumaišytas su fiziologiniu tirpalu (be adjuvanto) suleidžiamas į triušio ausies veną.

2. Kraujo paėmimas. Kraujas paimamas 3-ią dieną po paskutinio, intraveninio, virusinio ag suleidimo imunizuojamam triušiui. Kraujas buvo surinktas į stiklinius mėgintuvėlius ir 30 min. laikomas 37° C termostate. Vėliau plona lazdele apvedamas kraujo krešulys, kad nepriliptų prie stiklinių mėgintuvėlių sienelių ir mėgintuvėliai per nakt laikomi 4° C šaldytuve. Kitą dieną atsargiai nuimamas koaguliavęs krešulys, serumas išpilstomas į centrifuginius mėgintuvėlius ir centrifuguojamas 5000 g 10-15 min. Antikūnų (ak) išsodinimui buvo naudojamas sotus (50 %) amonio sulfato tirpalas. Gauta ak suspensija supilama į sterilius mėgintuvėlius ir pridėjus glicerolio (1:1), padedama tolesniam saugojimui 4° C arba -20° C.

2.2.4.2. Antikūnų konjugavimas su krienų peroksidaze

Antikūnų konjugavimas su peroksidaze buvo vykdomas pagal šiek tiek modifikuotą G. B. Wisdom (2004) metodiką. Ak (0,5 ml) supilami į dializės maišelius. Dializuojama per nakt prieš 0,01 M natrio karbonatinį buferį (pH 9,5) 4° C temperatūroje. Ak ir konjuguojamos peroksidazės santykis turi būti 1:1. Peroksidazė paruošiama konjugacijai: 5 mg peroksidazės ištirpinama 1 ml dejonizuoto vandens ir pridėjus 250 µl 0,2 M NaIO₄ 20 min. paliekama inkubuotis kambario temperatūroje tamsoje. Tada peroksidazės tirpalas su NaIO₄ nudruskinamas per Sephadex G-25 kolonėlę. Kolonėlė atplaunama su PBS (5-10 tūrių) ir užpilama 20 % etanolio/PBS tirpalu. Gauta aktyvuota peroksidazė sumaišoma su per nakt dializuotais ak ir 1/10 tūrio 0,2 M natrio karbonatinio buferio (mišinio pH turi būti apie 9,5). Mišinys inkubuojamas 2 val. kambario temperatūroje tamsoje ant purtyklės. Į tirpalą įdedama NaBH₄ iki galutinės koncentracijos 0,2-0,4 mg/ml ir inkubuojama 2 val. 4° C temperatūroje. Po inkubacijos konjugatas dializuojamas per nakt 4° C prieš

PBS. Saugojimui į konjugatą pridedama iki galutinės koncentracijos 2 % BSA ir iki 50 % glicerolio. Konjugatas saugomas -20° C temperatūroje.

2.2.5. Imunofermentinė analizė

2.2.5.1. Netiesioginė IFA. Polikloninių antikūnų titras.

Į mikroplokštelės (Nunc, Danija) šulinėlius pilama po 50 µl, 5 µg/ml koncentracijos išgryninto viruso preparato, praskiesto imobilizacijos buferyje. Inkubuojama per naktį 4° C. Kitą dieną išpilamas tirpalas su ag ir reakcija yra blokuojama 30 min. blokavimo buferiu (pilama po 150 µl į kiekvieną šulinėlį). Mikroplokštelė po kiekvieno sekančio etapo plaunama 5 kartus plovimo buferiu PBS-T. Pašalinus praplovimo buferį į šulinėlius pilama po 100 µl polikloninio antiserumo, praskiesto santykiu nuo 1:200 iki 1:102400 kartų PBS-T buferyje. Inkubuojama 1 val. kambario temperatūroje. Po praplovimo į kiekvieną mikroplokštelės šulinėlį pilama po 50 µl antrinių triušių ak, gautų iš ožkos, konjuguotų su peroksidaze (praskiesti 1:3000 kartų PBS-T). Inkubuojama 1 val. kambario temperatūroje. Specifinė reakcija išryškinama TMB substratu, reakcija stabdoma 3,6 % H₂SO₄. Sugertis matuojama spektrofotometru (Tecan, Austrija) 450 nm bangos ilgyje.

2.2.5.2. Tiesioginė IFA. Konjugatų su peroksidaze titras.

Tiesioginė IFA vykdoma taip pat kaip ir 2.2.5.1 skyriuje aprašytas netiesioginės IFA metodas, išskyrus tai, kad po blokavimo į šulinėlius dedama po 100 µl polikloninių ak-peroksidazės konjugato, praskiesto santykiu nuo 1:100 iki 1:6400 kartų PBS-T buferyje. Mikroplokštelė inkubuojama 1 val. kambario temperatūroje. Specifinė reakcija nustatoma 2.2.5.1 skyriuje aprašytu būdu.

2.2.5.3. Tiesioginė dvisluoksnio antikūnų sumuštinio IFA

Tiesioginė dvisluoksnio ak sumuštinio IFA (DAS-IFA) buvo atliekama pagal M. F. Clark ir N. A. Adams metodiką (1977).

1. IgG praskiedžiami 1:1000 arba 1:500 kartų su padengimo buferiu. Į kiekvieną mikroplokštelės šulinėlį pilama po 100 µl praskiesto IgG.
2. Inkubuojama 37° C 2-4 val. arba 4° C temperatūroje per naktį.
3. Mikroplokštelė praplaunama su plovimo buferiu (PBS-T). Plovimas kartojamas 5 kartus.
4. Į nusausintos mikroplokštelės šulinėlius pilama po 100 µl testuojamo mėginio (ekstrahuoto mėginio ekstrakcijos buferyje).
5. Inkubuojama per naktį 4° C temperatūroje.
6. Praplovus mikroploštelę į kiekvieną šulinėlį pilama po 100 µl anti-viruso konjugato, atskiesto 1:1000 arba 1:4000 kartų konjugacijos buferyje.
7. Inkubuojama 37° C temperatūroje 4 valandas.
8. Praplovus mikroploštelę į kiekvieną šulinėlį pilama po 200 µl šviežiai paruošto substrato (10 mg p-nitrofenilfosfato, ištirpinto 10 ml substrato buferyje). Inkubuojama tamsoje kambario temperatūroje 60-120 minučių.
9. Rezultatai fiksuojami spektrofotometriškai, matuojant sugertį 405 nm bangos ilgyje spektrofotometru (Multiskan RC Labsystems).

2.2.5.4. Tiesioginė trisluoksnio antikūnų sumuštinio IFA

Tiesioginė trisluoksnio ak sumuštinio IFA (TAS-IFA) buvo atliekama pagal M. F. Clark ir N. A. Adams metodiką (1977).

1. IgG praskiedžiami 1:1000 arba 1:500 kartų su padengimo buferiu. Į kiekvieną mikroplokštelės šulinėlį pilama po 100 µl praskiesto IgG.
2. Inkubuojama 37° C 2–4 val. arba 4° C temperatūroje per naktį.
3. Mikroplokštelė praplaunama su plovimo buferiu (PBS-T). Plovimas kartojamas 5 kartus.

4. Į kiekvieną mikroplokštelės šulinėlį pilama po 200 µl 1 % kiaušinio albumino (arba 2 % nugriebto pieno miltelių) PBS-T buferyje.
5. Reakcija blokuojama 30 min. 37° C temperatūroje.
6. Pašalinamas blokavimo tirpalas ir mikroplokštelė praplaunama 5 kartus kaip 3 punkte.
7. Į nusausintos mikroplokštelės šulinėlius pilama po 100 µl testuojamo mėginio (ekstrahuoto mėginio ekstrakcijos buferyje).
8. Inkubuojama per naktį 4° C temperatūroje.
9. Mikroplokštelė praplaunama 5 kartus kaip 3 punkte.
10. Į kiekvieną mikroplokštelės šulinėlį pilama po 100 µl monokloninių antikūnų (m-ak) (atitinkamai praskiestų konjugacijos buferyje).
11. Inkubuojama 37° C 2-4 val.
12. Mikroplokštelė praplaunama 5 kartus kaip 3 punkte.
13. Į kiekvieną mikroplokštelės šulinėlį pilama po 100 µl antrinių triušio ak, gautų iš pelės ir konjuguotų su šarmine fosfotaze (RaM-ap) (atitinkamai praskiestų konjugacijos buferyje).
14. Inkubuojama 37° C 2 val.
15. Praplovus mikroplokštelę į kiekvieną šulinėlį pilama po 200 µl šviežiai paruošto substrato (10 mg p-nitrofenilfosfato, ištirpinto 10 ml substrato buferyje). Inkubuojama tamsoje kambario temperatūroje 30-60 minučių.
16. Rezultatai fiksuojami spektrofotometriškai, matuojant sugertį 405 nm bangos ilgyje spektrofotometru (Multiskan RC Labsystems).

2.2.6. Rizomanijos diagnostinis ekspres testas

Rizomanijos diagnostinio ekspres testo (*angl.* Rhizomania Pocket diagnostic lateral flow test) (*Strube-Dieckmann*, Vokietija) metu cukrinių runkelių šaknelės, turinčios į rizomaniją panašius simptomus, susmulkinamos į mažus gabalėlius ir sudedamos į plastmasinį buteliuką, kuriame yra metaliniai šratai audinio homogenizacijai ir buferis su NaN_3 . Pakračius apie 30 s su pipete užlašinami 2-3 lašai gauto ekstrakto ant ekspres testo prietaiso langelio. Esant teigiamam rezultatui, mėlynos spalvos linija pasirodo prietaiso langelyje.

Ekspres testas pagrįstas specifine antikūnų su antigenais sąveika. Šis testas atliekamas tik greitam rizomanijos ligos patikrinimui. Atrinkti teigiamai sureagavę mėginiai turi būti patvirtinti kitais diagnostiniais metodais.

2.2.7. Totalinės RNR išskyrimas

RNR gali būti išskiriama iš šaldytos, šviežios ar liofilizuotos augalinės medžiagos naudojant skystą azotą. Mėginiai sutrinami užpylus skysto azoto. Dalis susidariusių sutrintų miltelių perkeliama į *Eppendorf* tipo mėgintuvėlius ir laikoma ant ledo. Toliau RNR išskyrimo procedūra atliekama pagal "QuickPrep total RNA extraction kit for the direct isolation of total RNA from most eukaryotic tissues or cells" (*Amersham Bioscience*) arba „TRIZol Reagent“ (*Invitrogen*) rinkinių pateiktas rekomendacijas.

2.2.8. BNYVV analizė PCR metodais

Įvairūs PCR metodai buvo taikomi rizomanijos sukėlėjo analizei: atvirkštinės transkripcijos polimerazinė ciklinė reakcija (AT-PCR), lizdinė PCR (*angl.* nested PCR, nPCR), daugybinė AT-PCR (*angl.* multiplex RT-PCR, mRT-PCR), serologiškai imobilizuoto viruso AT-PCR (*angl.* immunocapture RT-PCR, IC-RT-PCR). PCR metodai buvo naudojami įvairiais tikslais: BNYVV aptikimui ir identifikacijai, nustatant BNYVV tipą, amplifikuojant specifines viruso genomo sritis sekoskaitai ir restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo (RFLP) analizei. Kiekvienu atveju buvo parenkamos specifinės PCR reakcijos sąlygos ir pradmenys.

2.2. lentelėje pateikiami visų panaudotų PCR metodų temperatūriniai režimai.

2.2. lentelė. PCR temperatūriniai režimai.

PCR panaudojimas	PCR temperatūros režimai	PCR produktas, bp	Pastabos
BNYVV CP geno fragmento padauginimui	37° C – 30 min.; 94° C – 2 min.; 30 ciklų: 94° C – 1 min.; 55° C – 1 min.; 72° C – 1 min.; 72° C – 3 min.; 4° C – ∞.	500	Vieno žingsnio AT-PCR ir vieno žingsnio serologiškai imobilizuoto viruso AT-PCR
BNYVV CP geno lizdinė PCR (nPCR)	94° C – 2 min.; 30 ciklų: 94° C – 1 min.; 58° C – 1 min.; 72° C – 1 min.; 72° C – 3 min.; 4° C – ∞.	326	Kaip matrica naudojama anksčiau gautas CP geno produktas (500 bp) ir nPCR reikalingi specifiniai pradmenys
BNYVV viso CP geno padauginimui	94° C – 3 min.; 35 ciklai: 94° C – 1 min.; 61° C – 1 min.; 74° C – 1 min.; 72° C – 10 min.; 4° C – ∞.	567	Dviejų žingsnių AT-PCR
BNYVV p25 geno padauginimui	94° C – 3 min.; 35 ciklai: 94° C – 1 min.; 64° C – 1 min.; 72° C – 1 min.; 72° C – 10 min.; 4° C – ∞.	719	Dviejų žingsnių AT-PCR
BNYVV P42 geno padauginimui (RFLP analizei)	94° C – 3 min.; 30 ciklų: 94° C – 30 s; 54° C – 30 s; 72° C – 2.5 min.; 72° C – 7 min.; 4° C – ∞.	1160	Dviejų žingsnių AT-PCR
BNYVV TGB geno padauginimui	37° C – 30 min.; 95° C – 5 min.; 30 ciklų: 94° C – 40 s; 60° C – 40 s; 72° C – 45 s; 72° C – 10 min.; 4° C – ∞.	722	Vieno žingsnio AT-PCR

BNYVV A/B tipo nustatymui	94° C – 1 min.; 45 ciklai: 94° C – 20 s; 66° C – 20 s; 72° C – 20 s; 72° C – 10 min.; 4° C – ∞.	324/178	Kaip matrica naudojama anksčiau gautas TGB geno produktas (722 bp) ir A/B tipui specifiniai pradmenys
BNYVV/ BSBV / BVQ daugybinė AT-PCR	94° C – 3 min.; 35 ciklai: 94° C – 30 s; 63° C – 30 s; 72° C – 2 min.; 72° C – 7 min.; 4° C – ∞.	545/ 399/ 291	Dviejų žingsnių AT-PCR

2.2.8.1. Atvirkštinės transkripcijos polimerazinė ciklinė reakcija

Daugumos augalų virusų genetinė medžiaga yra RNR, todėl polimerazinėje ciklinėje reakcijoje naudojamas papildomas atvirkštinės transkripcijos etapas, kuriame fermentas – atvirkštinė transkriptazė – RNR paverčia į kopijinę DNR (kDNR), kurią galima padauginti PCR metodu.

AT-PCR buvo atliekama naudojant MBI Fermentas buferinius tirpalus, dNTP mišinius, 25 mM MgCl₂, termostabilią Taq polimerazę, M-MuLV AT (Moloney pelių leukemijos viruso atvirkštinė transkriptazė), ribonukleazijų inhibitorių. BNYVV nustatymui galima naudoti vieno žingsnio (kai iš karto vyksta atvirkštinė transkripcija ir PCR) ir dviejų žingsnių AT-PCR (kai kDNR sintezė ir PCR vykdoma atskirai).

Vieno žingsnio AT-PCR vykdoma viename mėgintuvėlyje paruošus specialų mišinį (dejonizuotas H₂O + DEPC, 10×PCR buferis, 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, 0,2 mM tiesioginis ir atvirkštinis pradmenys, 200 u/μl M-MuLV AT, 5 u/μl Taq polimerazė) ir priklausomai nuo panaudotų pradmenų, parenkamos specifinės reakcijos sąlygos ir naudojamas skirtingas termociklerio temperatūrų režimas. AT-PCR reakcijai naudojama po 48 μl mišinio ir 2 μl mėginio RNR. Bendras tūris – 50 μl. Naudojamos vandens ir sveiko augalo kontrolės. Gautų produktų analizė atliekama 5 % poliakrilamido arba 1-2 % agarozės geliuose.

Dviejų žingsnių AT-PCR vykdoma atskiruose mėgintuvėliuose. Iš pradžių gaunama kDNR, o vėliau vykdoma PCR.

Bendra dviejų žingsnių AT-PCR eiga:

1. RNR paruošimas

Į sterilius plonasienius PCR mėgintuvėlius dedama po:

- 3 µl mėginio išvalytos totalinės RNR,
- 2 µl atvirkštinio pradmens (20 µM),
- 6 µl dejonizuoto H₂O + DEPC.

Švelniai pamaišoma. Mėginiai dedami į termociklerį, naudojami tokie temperatūriniai režimai:

- 70° C – 5 min.;
- 4° C – ∞.

2. kDNR sintezė

Paruošiamas kDNR mišinys. 1 mėginiui reikia:

- 4 µl 5×PCR buferio,
- 1,5 µl dejonizuoto H₂O + DEPC,
- 2 µl 10 mM dNTP,
- 0,5 µl (40 u/µl) ribonukleazių inhibitoriaus
- 1 µl (200 u/µl) atvirkštinės transkriptazės

Paruoštas mišinys perpilstomas į mėgintuvėlius su anksčiau paruošta RNR. Reakcija vykdoma termocikleryje pagal programą:

- 42° C – 60 min.;
- 70° C – 10 min.;
- 4° C – ∞.

3. PCR

Kiekvienai PCR reakcijai paruošiamas specialus PCR mišinys (dejonizuotas H₂O + DEPC, 10×PCR buferis, 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, 20 µM tiesioginis ir atvirkštinis pradmenys, 5 u/µl Taq polimerazė) ir, priklausomai nuo panaudotų pradmenų, parenkamos specifinės reakcijos sąlygos bei naudojamas skirtingas termociklerio temperatūrų režimas. PCR reakcijai naudojama po 46-45 µl PCR mišinio ir 4-5 µl mėginio kDNR. Bendras tūris – 50 µl. Naudojamos reakcijos mišinio ir sveiko augalo

kontrolės. Gautų produktų analizė atliekama 5 % poliakrilamido arba 1-2 % agarozės geliuose.

2.2.8.2. Lizdinė PCR (nPCR)

nPCR buvo atliekama naudojant MBI Fermentas buferinius tirpalus, dNTP mišinius, 25 mM MgCl₂, termostabilią Taq polimerazę.

nPCR vykdoma viename mėgintuvėlyje paruošus specialų mišinį (dejonizuotas H₂O + DEPC, 10×PCR buferis, 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, 5 μM tiesioginis ir atvirkštinis pradmenys, 5 u/μl Taq polimerazė. nPCR reakcijai naudojama po 49,5 μl mišinio ir 0,5 μl PCR produkto (500 bp), gauto standartinės AT-PCR būdu. Bendras reakcijos tūris – 50 μl. Naudojamos vandens ir sveiko augalo kontrolės. Reakcijai panaudoti temperatūriniai režimai nurodyti 2.2. lentelėje. Gautų produktų analizė atliekama 5 % poliakrilamido arba 1-2 % agarozės gelyje.

2.2.8.3. Serologiškai imobilizuoto viruso AT-PCR

1. PCR *Eppendorf* tipo mėgintuvėlius padengiamo viruso antikūnais. Į kiekvieną mėgintuvėlį pilama po 100 μl antikūnų (1:1000 praskiestų padengimo buferyje).
2. Mėgintuvėliai inkubuojami 37° C temperatūroje 3 valandas.
3. Po inkubacijos praplaunami kelis kartus praplovimo buferiu (PBS-T).
4. Mėgintuvėliai padengiami tiriamaisiais augaliniais mėginiais. Į kiekvieną mėgintuvėlį pilama po 100 μl mėginio (1:3 ekstrahuoto mėginio ekstrakcijos buferyje) ir inkubuojami per naktį 4° C temperatūroje.
5. Toliau atliekami tokie patys etapai kaip ir AT-PCR, t.y. atliekama vieno ar dviejų žingsnių AT-PCR.
6. Rezultatų analizė atliekama 5 % poliakrilamido arba 1-2 % agarozės geliuose.

2.2.9. BNYVV tipų nustatymas

BNYVV tipų nustatymui buvo naudojama restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo analizė ir daugybinė AT-PCR

2.2.9.1. Restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo analizė

RFLP analizei buvo naudojami specifiniai pradmenys p42 geno padauginimui (Kruse ir kt., 1994) bei naudotos *TaqI*, *HincII*, *AccI* ir *BstUI* restrikcijos endonukleazės (*MBI Fermentas*).

Vieno mėginio restrikcijos mišinio sudėtis:

1. 18 µl dejonizuoto H₂O + DEPC,
2. 2 µl 10 × Tango buferio,
3. 8 µl PCR būdu padauginto produkto,
4. po 2 µl kiekvienos restrikcijos endonukleazės: *TaqI*, *HincII*, *AccI* ir *BstUI*.

Mėginiai buvo inkubuojami 37° C temperatūroje 1-16 val. Rezultatų analizė atliekama 5 % poliakrilamido arba 1-2 % agarozės geliuose.

2.2.9.2. BNYVV tipų nustatymas daugybine AT-PCR

BNYVV tipų nustatymui buvo naudojama dviejų etapų PCR: pirmo etapo metu vykdoma AT-PCR panaudojant specifinius pradmenis TGB geno padauginimui. Antro etapo metu vykdoma nPCR kaip matricą panaudojant anksčiau TGB geno fragmentą ir naudojami BNYVV A/B tipui specifiniai pradmenys. Reakciją galima atlikti tiek su visų pradmenų mišiniu, tiek atskirai panaudojant kiekvienam tipui specifinius pradmenis (Ratti ir kt., 2005).

2.2.10. DNR elektroforezė

2.2.10.1. DNR elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje

DNR elektroforezė atliekama 5 % poliakrilamidiniame gelyje Tris-boratiniame buferiniame tirpale, naudojant vertikalų elektroforezės aparatą, esant 140 V įtampai. Pasibaigus elektroforetiniam frakcionavimui, gelis dažomas 20 min. etidžio bromido tirpale (1 µg/ml), po to atplaunamas nuo nesurišto dažo vandenyje ir analizuojamas transiliuminatoriaus UV šviesoje. Produktai fiksuojami Bio-Rad GelDoc XR gelių dokumentavimo sistema.

2.2.10.2. DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR elektroforezė atliekama 1-2 % agarozės gelyje Tris-boratiniame arba Tris-acetatiname buferiniame tirpale, naudojant horizontalias agarozės plokšteles, esant 60-80 V įtampai. Pasibaigus elektroforetiniam frakcionavimui, gelis dažomas 20 min. etidžio bromido tirpale (1 µg/ml), po to atplaunamas nuo nesurišto dažo vandenyje ir analizuojamas transiliuminatoriaus UV šviesoje. Produktai fiksuojami Bio-Rad GelDoc XR gelių dokumentavimo sistema.

2.2.11. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio

Skiriant DNR iš agarozės gelio, paruošiamas 1-2 % gelis su platesnėmis duobutėmis, į kurias įnešami DNR mėginiai. Po elektroforezės reikalingas DNR fragmentas išpjaunamas iš gelio skalpeliu, susmulkinamas ir patalpinamas į *Eppendorf* tipo mėgintuvėlį. Toliau DNR fragmentų skyrimui naudojamas "DNA extraction kit" (*MBI Fermentas*). Išskyrimas vykdomas pagal rinkinyje pateiktas rekomendacijas.

2.2.12. Nukleotidinių sekų kompiuterinė analizė

PCR produktų nukleotidų sekas nustatė Biotechnologijos instituto DNR Sekvenavimo Centras (Vilnius, Lietuva) ir „Macrogen“ (Korėja). Sekoskaitos metodu gautos sekos, naudojant DNASTAR programą buvo apjungiamos į vientisą seką, kad persidengtų tarpusavyje, kas yra reikalinga rezultatų tikslumui.

Sekos buvo analizuojamos naudojant BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), ProtParam tool (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) ir EMBOSS Transeq (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/index.html>) programas.

Sekoskaitos metodu gautos sekos ir sekos, gautos iš tarptautinio Genų banko duomenų bazės (Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), buvo analizuojamos konstruojant filogenetinius medžius. Taip buvo nustatytas BNYVV giminingumas. Filogenetiniai medžiai buvo konstruojami ClustalW (Thompson ir kt., 1994) ir MEGA 4.1 (Tamura ir kt. 2007) kompiuterinėmis programomis. Tiriamos sekos buvo įkeliamos į ClustalW programą. Sekos buvo palyginamos, pašalinamos sekų vietos su iškritomis ir nubraižomas neighbor joining (N-J) medis, naudojant artimiausių grupių apjungimo metodą pagal 1000 medžių statistinio patikimumo analizę. Filogenetinis medis buvo gaunamas MEGA 4.1 programoje, ir atitinkamai apipavidalinamas įvairiomis kompiuterinėmis piešimo programomis.

2.2.13. Baltymų NDS poliakrilamidinio gelio elektroforezė

Baltymų elektroforezė atliekama pagal U. K. Laemmli (1970) metodiką vertikaliame aparate, naudojant 4 % koncentruojamąjį bei 10 arba 12 % skiriamąjį gelius.

1. Paruošiamas apatinis-skiriamasis gelis. Tirpalai gerai sumaišomi, ir gelis polimerinamas poliakrilamido gelio paruošimo gardelėje. Kad

poliakrilamidinio gelio paviršius būtų lygus, prieš polimerizaciją užsluoksniuojamas izopropanolis, kuris po polimerizacijos nupilamas ir praplaunama distiliuotu vandeniu.

2. Paruošiamas viršutinis-koncentruojantis gelis. Tirpalas gerai išmaišomas ir užpilamas ant skiriamojo gelio paviršiaus. Įdedamos „šukos“, geliui susipolimerinus, „šukos“ atsargiai išimamos.
3. Ruošiami mėginiai elektroforezei. Ag turi būti užnešama į takelį 1-10 µg, nuo 10-20 µl. Mėginiai (išgryninta viruso suspensija arba infekuoti augaliniai mėginiai, sutrinti PBS-T buferyje) sumaišomi su mėginio dažo buferiu (buferio sudėtyje turi būti indikatorinio dažo ir denatūruojančio agento), mėginiai 5 min. pavirinami 95-100° C temperatūroje.
4. Elektroforezė vykdoma, esant 20-60 mA nuolatiniam srovės stiprumui ir 200 V įtampai.

2.2.13.1. Poliakrilamidinio gelio dažymas

Atlikus elektroforezę poliakrilamidinis gelis yra:

- a) įmerkiamas į vonelę su Kumasi briliantiniu mėlio dažu ir švelniai kratomas 30-45 min. purtyklėje. Dažas nupilamas, o gelis užpilamas blukikliu. Plovimas tęsiasi 1-2 val. purtant ir keičiant blukiklį kas 30 min.;
- b) įmerkiamas į vonelę su PageBlue™ baltymų dažu ir švelniai kratomas 60 min. purtyklėje. Dažas nupilamas, o gelis blukinamas distiliuotame vandenyje.

2.2.14. Imunoblotas

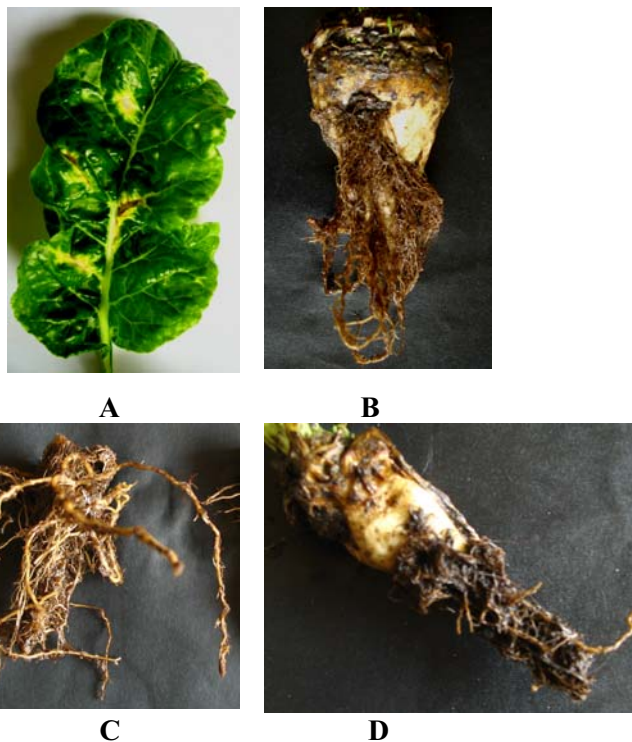
1. Baltymų mišiniai yra elektroforetiškai frakcionuojami denatūruojančiuose poliakrilamido geliuose. Iš poliakrilamidinio gelio baltymai pernešami ant PVDF (polivinildifluorido) membranos. Membrana atkerpama tiksliai gelio dydžio. Paruošiami aštuoni 1 mm storio tokio pat dydžio filtrinio popieriaus lakštai.

2. Po elektroforezės poliakrilamidinis gelis įmerkiamas į baltymų pernešimo buferį. Membrana perplaunama metanolio ir, kaip ir gelis, mirkoma apie 10 min. baltymų pernešimo buferyje. Filtrinis popierius prieš naudojimą taip pat suvilgomas baltymų pernešimo buferiu.
3. Tada atliekamas pusiau sausas išfrakcionuotų baltymų pernešimas ant membranos. Ant baltymų pernešimo aparato katodinio pado sudedami išmirkyti 4 filtrinio popieriaus lakštai, po to membrana, gelis ir vėl filtrinis popierius. Viskas iš viršaus prislegiama anodiniu aparato padu ir 40 min. vykdomas baltymų pernešimas iš gelio ant membranos, esant 40 mA nuolatinės srovės stiprumui.
4. Membrana praplaunama PBS-T ir po to blokuojama PBS buferiu su 1 % želatinos 30-60 min. kambario temperatūroje.
5. Membrana praplaunama 2 kartus PBS-T. Paruošiamas ak tirpalas su 1 % želatinos ir 0,1 % Tween (PBS-T). Membrana inkubuojama su antikūnais 1-2 val. kambario temperatūroje.
6. Membrana praplaunama 5-6 kartus PBS-T. Paruošiamas antrinių antikūnų tirpalas su 1 % želatinos ir 0,1 % Tween (PBS-T). Inkubuojama 1 val. kambario temperatūroje.
7. Membrana praplaunama 7-8 kartus PBS-T, inkubuojant 2-3 kartus po 5 min. ant purtyklės. Po to praplaunama 2-3 kartus distiliuotu vandeniu.
8. Membrana ryškinama TMB substratu peroksidazei arba BCIP/NBT substratu fosfotazei.
9. Membrana praplaunama vandeniu, išdžiovinama ir nuskenuojama skeneriu. Nuo šviesos peroksidazės substratas išblunka per 3-7 dienas.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Rizomanijos simptomai, paplitimas ir identifikacija DAS-IFA metodu

Pagrindiniai rizomanijos simptomai yra cukrinių runkelių šaknų sutankėjimas, kuokštiškumas, augalo žemaūgiškumas, lapų raukšlėtumas, vytimas, chlorozė, gyslų pageltimas bei nekrozė. Dažniausiai BNYVV yra aptinkamas cukrinių runkelių šaknyse ir labai retai juda į augalo viršutinę dalį, sukeldamas geltonų gyslų simptomą lapuose (Tamada ir kt., 1989). Išskirti užkrėsti cukriniai runkeliai su tipiškais rizomanijos simptomais iliustruoti 3.1. paveiksle.



3.1. pav. Tipiški rizomanijos simptomai: A – cukrinio runkelio lapas su pageltusiomis gyslomis ir nekroze. **B, C, D** – cukrinių runkelių šaknys su pagausėjusiomis dalinai nekrotizuotomis antrinėmis šaknelėmis.

3.1. A paveiksle parodyti rizomanijos pažeisto cukrinio runkelio lapo simptomai – pageltusios nekrotinės gyslos, kurios išsivystė auginant runkelį šiltnamyje keletą metų. 3.1. B, C, D paveiksle matosi pagrindinis rizomanijos simptomas runkeliuose – smulkių šoninių šaknelių proliferacija, pagrindinės šaknies susmulkėjimas ir šakojimasis.

Lietuvoje auginamų cukrinių runkelių plotas siekia daugiau kaip 20000 hektarų. Cukrinių runkelių rizomanijos tyrimai buvo atliekami nuo 1998 metų naudojant DAS-IFA metodą (Lietuvos valstybinė augalų apsaugos tarnyba). Rizomanijos diagnostinis ekspres testas buvo atliekamas greitam rizomanijos ligos aptikimui cukrinių runkelių pasėliuose Šakių ir Kauno rajonuose. BNYVV infekcija teigiamai reagavusių šaknų ekstraktuose buvo patvirtinta kitais diagnostiniais metodais. DAS-IFA – jautrus imunologinis metodas, galintis identifikuoti labai mažą viruso koncentraciją (1-10 ng/ml) augale bei tinkamas kaip rutininis metodas išskirti augalus, užkrėtus BNYVV. DAS-IFA reakcija įvertinama spektrofotometriškai, teigiamai įvertinami tie augaliniai mėginiai, kurių optinis tankis 3 ar daugiau kartų didesnis už neigiamą kontrolę (Clark ir Adams, 1977).

2004 metais buvo aptikta pirma rizomanijos radavietė Lietuvos pietvakariuose (Šakių raj.) (Jackeviciene ir kt., 2005). 2005 m. antra rizomanijos infekcijos radavietė buvo aptikta centrinėje Lietuvos dalyje (Kauno raj.) (Žižytė ir kt., 2006; Zizyte ir Staniulis, 2007a). Trečioji BNYVV infekcijos radavietė buvo aptikta 2007 m. Panevėžio rajone Ėriškių kaime (Valstybinė augalų apsaugos tarnyba). Visi trys BNYVV izoliatai buvo padauginoti indikatoriniuose augaluose ir saugomi išsamesniems viruso tyrimams. 2009 m. Lietuvoje cukrinių runkelių pasėliuose tikrintuose runkelių mėginiuose rizomanija buvo aptikta tik Kauno rajone, kur prieš tai buvo aptikta antroji rizomanijos radavietė. Šakių rajono vietovėse, kur anksčiau buvo nustatytas BNYVV, cukriniai runkeliai nebebuvo auginami. Šie rezultatai pateikiami 3.1. lentelėje (kur nurodoma mėginių radavietė, tiriamų augalų skaičius ir teigiamų tiesioginės DAS-IFA rezultatų skaičius).

3.1. lentelė BNYVV tyrimo 2009 m. Lietuvoje surinktuose cukrinių runkelių šaknų mėginiuose tiesioginės DAS-IFA rezultatai.

Radavietė	Tyrinėtų mėginių skaičius	Teigiamas rezultatas
Kauno raj., ūkininko Stankio laukas	2	2
Kauno raj., Babtų apylinkė ūkininko Svičiulio laukas	2	0
Kauno raj., Babtų seniūnija	2	0
Kauno raj., ūkininko Koženiausko laukas	2	0
Kauno raj., prie Panevėžiuko	2	0
Šakių raj., Griškabūdis	6	0
Šakių raj., Sintautų km.	2	0
Vilkaviškio raj., Rumokų bandymų stotis	3	0
Vilkaviškio raj., Serdokų km.	2	0
Marijampolės raj. prie Marijampolės miesto	4	0
Marijampolės raj., Brukų km.	2	0
Kėdainių raj., Krekenava	2	0
Kėdainių raj., Josvainiai	2	0
Kėdainių raj., ūkininko Lukošiaus laukas	2	0

2009 m. cukrinių runkelių šaknų mėginiai su įtariamais rizomanijos simptomais buvo renkami ir Ukrainos cukrinių runkelių auginimo zonoje Rivnenska, Lvivska, Ternopilska, Ivano-Frankivska, Černivecka, Chmelnycka, Vinnycka ir Žytomyrska srityse. 7 mėginiai iš Kazachstano mums buvo perduoti Kazachstano Žemdirbystės Instituto mokslininkų. Runkelių šaknų mėginiai buvo analizuojami DAS-IFA metodu. Gauti tyrimų rezultatai pateikiami 3.2. lentelėje.

3.2. lentelė. BNYVV tyrimo 2009 m. Ukrainoje ir Kazachstane surinktuose cukrinių runkelių šaknų mėginiuose tiesioginės DAS-IFA rezultatai.

Radavietė	Tyrinėtų mėginių skaičius	Teigiamas rezultatas
Ukraina		
Radzyvylivskij raj., Rivnenska sritis, Krupec	9	8
Brody, Lvivska sritis	2	2
Radechivskij raj., Lvivska sritis, Chmilno	2	2
Radechivskij raj., Lvivska sritis, Babyči	4	2
Kamjanka-Buzkij raj., Lvivska sritis, Kamjanka-Buzka	3	0
Buzkij raj., Lvivska sritis, Ožydiv	4	4
Zoločivskij raj., Lvivska sritis, Pidgirci	3	0
Zoločivskij raj., Lvivska sritis, Strutyn	3	0
Čortkivskij raj., Ternopilska sritis, Oryškvici km.	3	3
Zalicšickij raj., Ternopilska sritis, Torske	2	2

Gorodenkivskij raj., Ivano-Frankivska sritis, Jaseniv-Pilnyj km.	3	3
Kicmanskij raj., Černivecka sritis, Berehomet	2	0
Novoselyckij raj., Černivecka sritis., Bojany km.	2	0
Chmelnycka sritis, Starokostjantyniv	4	1
Starokostjantynivskij raj., Chmelnycka sritis, Ladygy	5	3
Chmilnyckij raj., Vinnycka sritis, Andrijašivka km.	2	0
Ružynskij raj., Žytomyrska sritis, Ružyn	4	0
Kazachstanas		
Talgarskij raj., privati kompanija „Nura“	2	0
Kazachstano Žemdirbystės Institutas	1	1
Taran km.	1	0
Iliyskij raj., Kojan-Koz km.	1	0
Džanbulskij raj., privati kompanija „Rauryk Batyr“	1	0
Iliyskij raj., privati kompanija „Čapajeva“	1	0

Iš pateiktų duomenų matome, kad BNYVV buvo identifikuotas trijuose Lietuvos, dešimtyje Ukrainos ir vienoje Kazachstano vietovėse. Šie izoliatai buvo atrinkti molekuliniais viruso tyrimams. Atrinktų izoliatų radavietės ir pavadinimai nurodyti 3.3. lentelėje.

3.3. lentelė. Molekuliniais tyrimams atrinkti BNYVV izoliatai.

Radavietė	Izoliato pavadinimas
Lietuva	
Panevėžio raj., Ėriškių km.	Pn
Kauno raj., ūkininko Stankio laukas	St
Šakių raj., Tupikų km.	T
Ukraina	
Radzyvylivskij raj., Rivnenska sritis, Krupec	Ukr2
Brody, Lvivska sritis	Ukr3
Radechivskij raj., Lvivska sritis, Chmilno	Ukr4
Radechivskij raj., Lvivska sritis, Babyči	Ukr5
Buzkij raj., Lvivska sritis, Ožydiv	Ukr6
Čortkivskij raj., Ternopilska sritis, Oryšktivci km.	Ukr7
Zalicšickij raj., Ternopilska sritis, Torske	Ukr8
Gorodenkivskij raj., Ivano-Frankivska sritis, Jaseniv-Pilnyj km.	Ukr9
Chmelnycka sritis, Starokostjantyniv	Ukr10
Starokostjantynivskij raj., Chmelnycka sritis, Ladygy	Ukr11
Kazachstanas	
Kazachstano Žemdirbystės Institutas	Kzt12

3.2. Augalų indikatorių panaudojimas BNYVV identifikacijai ir viruso padauginimui

Iš Lietuvos, Ukrainos ir Kazachstano cukrinių runkelių pasėlių surinkti runkelių šaknų mėginiai, kuriuose pagal tiesioginės DAS-IFA duomenis buvo identifikuotas BNYVV, buvo naudojami indikatorinių augalų mechaninei inokuliacijai.

BNYVV buvo užkrėsti tiriamieji indikatoriniai augalai bei augalai, pripažinti BNYVV diagnostinėmis rūšimis. 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. Jautriuose BNYVV indikatoriniuose augaluose (*C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *T. expansa*) maždaug po 5-7 dienų išsryškėdavo vietinės chlorotinės pažaidos (3.2. pav.). Tik *N. benthamiana* ir *Spinacia oleracea* augaluose virusas sukėlė sisteminę reakciją. *N. benthamiana* sisteminė reakcija pasireiškė augalo žemaūgiškumu, lapų garbanotumu ir silpnu margumu, o *S. oleracea* – vietinėmis chlorotinėmis pažaidomis, margumu ir augalo žemaūgiškumu. Gauti rezultatai pateikiami 3.4. lentelėje.

BNYVV augalų šeimininkų spektras yra gana siauras, apribotas daugeliu *Chenopodiaceae* šeimos rūšių ir keliomis rūšimis, priklausančiomis *Aizoaceae*, *Amaranthaceae* ir *Solanaceae* šeimoms. Paprastai virusas sukelia vietines pažaidas ant daugumos augalų šeimininkų lapų (pvz., *C. quinoa*, *T. expansa*), sisteminę infekciją gali sukelti *Beta macrocarpa* Guss., *S. oleracea* ir *N. benthamiana* augalams (Tamada ir kt., 1989; Andika ir kt., 2005).

Gauti duomenys atitinka literatūroje nurodomus BNYVV pažeidžiamų augalų spektrą ir sukliamų simptomus (Tamada ir Baba, 1973; Tamada ir kt., 1989; Andika ir kt., 2005).

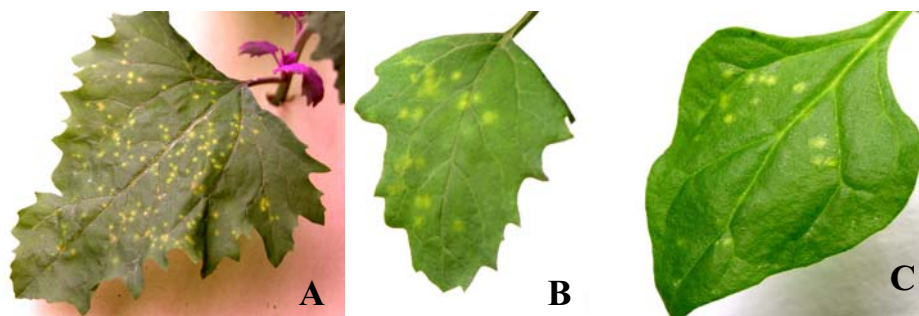
BNYVV padauginimui bei saugojimui buvo pasirinkti indikatoriniai augalai – *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *T. expansa*, kurie reagavo tik vietinėmis pažaidomis (3.2. pav.).

3.4. lentelė. Augalų indikatorių reakcija į mechaninę inokuliaciją BNYVV izoliatais.

Augalo rūšis	Izoliatas St		Izoliatas T	
	Simptomai	Atgalinė inokuliacija	Simptomai	Atgalinė inokuliacija
<i>Cucumis sativus</i> L.	-	-	-	-
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	-	-	-	-
<i>N. debneyi</i> Domin	-	-	-	-
<i>N. benthamiana</i> Domin	S, Mo, lapų garbanotumas	+	S, Mo, lapų garbanotumas	+
<i>N. rustica</i> L.	-	-	-	-
<i>N. tabacum</i> L. cv. 'Samsun'	-	-	-	-
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	-	-	-	-
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste et Reyn.	LL	+	LL	+
<i>C. quinoa</i> Willd	LL	+	LL	+
<i>Tetragonia expansa</i> Murr	LL	+	LL	+
<i>Atriplex hortensis</i> L.	-	-	-	-
<i>Celosia cristata</i> (L.) Kuntze	-	-	-	-
<i>Spinacia oleracea</i> L.	LL, Mo, S	+	LL, Mo, S	+

LL – vietinės chlorotinės pažeidimai, S – sisteminė infekcija (augalo žemaūgiškumas), Mo – margumas, „-“ nėra infekcijos, „+“ teigiama atgalinė inokuliacija (susidarę simptomai tokie patys, kaip užkrėstų pradinių indikatorių augalų).

Infekuota augalinė medžiaga su aiškiais simptomais buvo surinkta, patikrinta tiesioginės DAS-IFA, EM metodais bei sverinama, fasuojama, žymima ir saugoma minusinėje temperatūroje. *C. quinoa* augalas buvo pasirinktas viruso sukauptimui, kaip duodantis didžiausią BNYVV išėigą (Bouzoubaa, 1998), reikalingą viruso gryninimui.



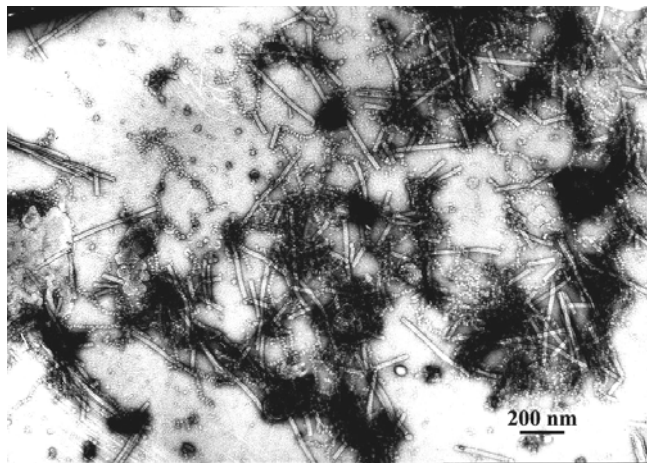
3.2. pav. Augalų indikatorių mechaninė inokuliacija BNYVV: vietinės chlorotinės pažeidimai ant indikatorių augalų lapų (A. *Chenopodium amaranticolor* B. *C. quinoa* C. *Tetragonia expansa*).

3.3. Rizomanijos sukėlėjo morfologijos nustatymas

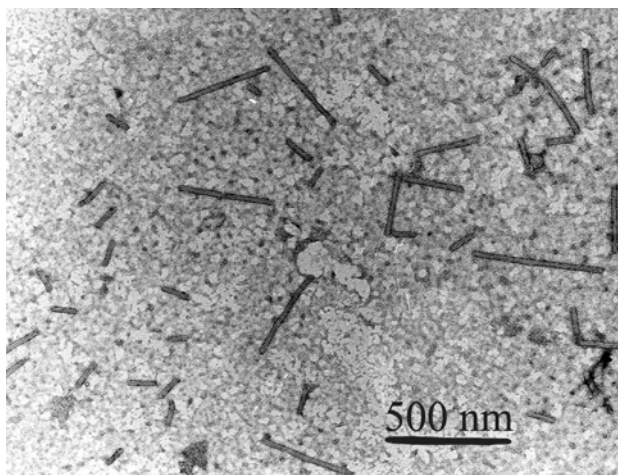
EM metodas buvo naudojamas virusinių dalelių aptikimui ir identifikacijai bei morfologinių savybių analizavimui preparatuose, paruoštuose iš įvairių infekuotų augalų (tiek cukrinių runkelių šaknelių, tiek indikatorinių augalų, kuriuose buvo mechaniškai perneštas virusas). Virusų dalelių aptikimui taip pat buvo naudojama IEM, sukurta K. S. Derrick (1973), kurioje virusinės dalelės pagaunamos iš suspensijos dėl specifinių antikūnų, padengtų ant tinklelio. Dėl to virusinės dalelės yra selektyviai adsorbuojamos prie tinklelio, neprisitvirtinusi augalo šeiminiųko medžiaga yra lengvai pašalinama, o virusinės dalelės labiau sukonzentruojamos.

Tiriamieji mėginiai buvo apdorojami negatyviniu kontrastuojančiu tirpalu (2 % UA) ir analizuojami peršviečiamuoju EM JEOL JEM-100S.

3.3. ir 3.4. paveiksluose yra pateiktos BNYVV dalelių iš infekuoto augalo EM ir IEM nuotraukos.



3.3. pav. EM nuotrauka (padidinimas 20000 ×): BNYVV virusinės dalelės iš mechaniškai inokuliuotos balandos *C. quinoa* ekstrakto.



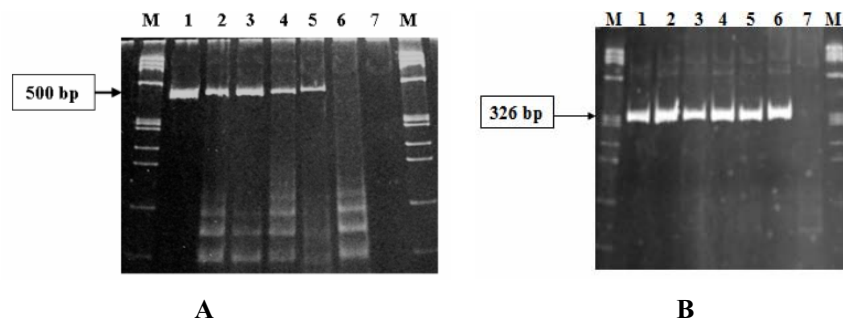
3.4. pav. IEM nuotrauka (padidėjimas 20000 ×): apie 20 nm diametro BNYVV charakteringos virusinės dalelės iš cukrinio runkelio šaknelių ekstrakto.

EM ir IEM tiriamų augalų su tipiškais BNYVV požymiais preparatuose buvo stebimos įvairaus ilgio, apie 20 nm diametro lazdelės formos BNYVV dalelės, kas atitinka literatūroje pateikiamus duomenis (Richards ir Tamada, 1992; Fauquet ir kt., 2005).

EM taip pat buvo naudojama BNYVV valymo, koncentravimo etapuose ir išgryninto viruso preparatų tyrimuose (Žižytė ir Staniulis, 2007b).

3.4. BNYVV identifikacija molekuliniais metodais

BNYVV identifikacijai buvo naudojama vieno arba dviejų žingsnių įprastinė AT-PCR, serologiškai imobilizuoto viruso AT-PCR ir nPCR. Įprastinei AT-PCR buvo pasirinkti specifiniai pradmenys, kurie amplifikuoja 500 bp fragmentą, esantį RNA 2 apvalkalo baltymo geno srityje (Henry ir kt., 1995; OEPP/EPPO, 2004). Šio fragmento padauginimui buvo naudojama viruso RNR išskirta iš indikatorinių augalų, mechaniškai inokuliuotų Lietuvoje išskirtais BNYVV izoliatais. 3.5. paveikslas A iliustruoja AT-PCR metu susidariusius produktus.

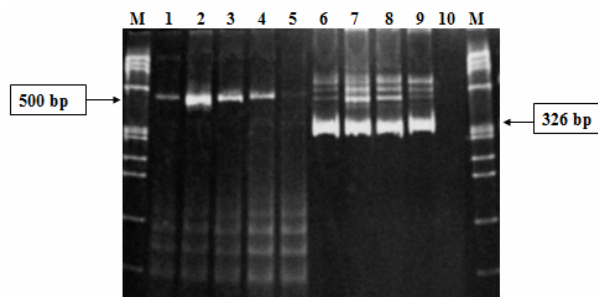


3.5. pav. PCR produktai 5 % poliakrilamidiniame gelyje: A. AT-PCR: M – markeris $\Phi\times 174$ DNA/BsuRI(Hae III); 1–4 – Lietuvoje išskirto St izoliato pvz.; 5 – K+; 6 – K–; 7 – Kv. **B. nPCR:** M – markeris $\Phi\times 174$ DNA/BsuRI(Hae III); 1 – K+; 2–6 – Lietuvoje išskirto St izoliato pvz.; 7 – K–.

BNYVV aptikimo jautrumo padidinimui buvo naudojamas nPCR metodas. Šis metodas padidina virusų aptikimo laipsnį 1000 kartų palyginus su įprastiniu AT-PCR metodu (Morris ir kt., 2001). Vykdamas nPCR buvo panaudoti vidiniai pradmenys, kurie standartinės PCR metu susidariusius produktus (500 bp) specialiai amplifikuoja, sudarant 326 bp produktus (pav. 3.5. B).

BNYVV identifikacijai buvo naudojamas ir serologiškai imobilizuoto viruso AT-PCR metodas. Šiame metode buvo naudojami tokie patys pradmenys, kaip ir įprastinėje AT-PCR. Metodo išskirtinumas yra toks, kad jame patogenas iš pradžių yra pagaunamas specifiniais antikūnais prieš BNYVV kaip ir DAS-IFA metode, o po to vykdoma AT-PCR tokiomis pačiomis sąlygomis, kaip ir įprastinės AT-PCR metu. Šios reakcijos metu susidarę 500 bp produktai (3.6. pav. 1-5 takeliai) taip pat buvo panaudoti vykdyti nPCR (3.6. pav. 6-10 takeliai).

nPCR metodas rekomenduojamas naudoti norint padidinti standartinės AT-PCR jautrumą bei specifiškumą, reikalingą ankstyvos virusinės infekcijos nustatymui, ir įvertinant cukrinių runkelių veislių atsparumą arba tolerantiškumą BNYVV (Morris ir kt., 2001).



3.6. pav. AT-PCR produktai 5 % poliakrilamidiniame gelyje: M – markeris $\Phi\times 174$ DNA/BsuRI(Hae III); 1–3 – serologiškai imobilizuoto Lietuvoje išskirto BNYVV St izoliato pvz.; 4 – K+; 5 – K–; 6–8 – nPCR produktai, gauti panaudojus serologiškai imobilizuoto BNYVV AT-PCR produktus; 9 – K+; 10 – Kv.

3.4.1. BNYVV tipų nustatymas

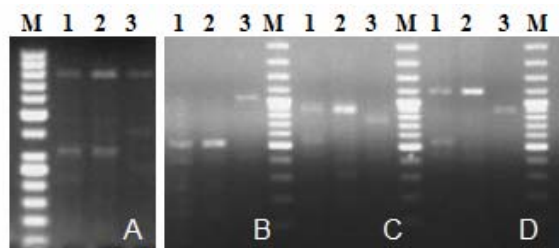
BNYVV turi tris pagrindinius (A, B ir P) tipus, kurie negali būti atskiriami serologiškai. Tačiau naudojant RFLP analizę, daugybinę AT-PCR bei lyginant viruso apvalkalo baltymo sekas, galima nustatyti BNYVV izoliatų tipus.

RFLP analizė

RFLP analizė yra paremta skirtingu restrikcijos endonukleazių poveikiu tam tikroms viruso geno sritims. RFLP analizei buvo pasirinkta BNYVV RNR 2 geno sritis (2133-3293 nt), kuri koduoja 42 kDa baltymą. Padaugintas AT-PCR būdu šis viruso fragmentas (1160 bp) gali turėti atpažinimo sekas specifinėms restrikcijos endonukleazėms (*TaqI*, *HincII*, *AccI* ir *BstUI*), kurios nurodytų BNYVV A arba B tipą (Kruse ir kt., 1994).

Tipų nustatymui RFLP būdu buvo naudojami Lietuvoje išskirti izoliatai (St, T ir Pn). Esant BNYVV A tipui, 1160 bp fragmente neturi būti *TaqI* ir *HincII* atpažinimo sekų, o tik *AccI* ir *BstUI* atpažinimo sekos. B tipo atveju, atvirkščiai, *TaqI* ir *HincII* kerpa 1160 bp fragmentą, o *AccI* ir *BstUI* – nekerpa.

3.7. pav. iliustruoja 1160 bp fragmento restrikcijos profilius veikiant *TaqI* (3.7. pav. A), *HincII* (3.7. pav. B), *AccI* (3.7. pav. C) ir *BstUI* (3.7. pav. D) restrikcijos endonukleazėms.

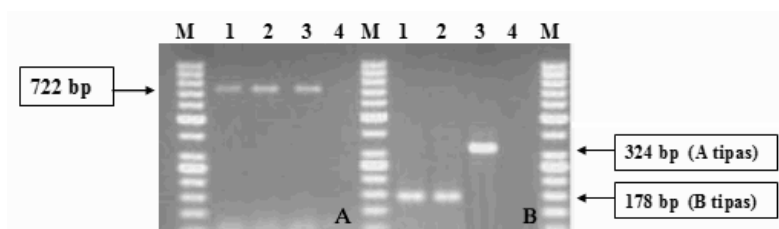


3.7. pav. Lietuvoje išskirtų izoliatų A/B tipų nustatymas RFLP analizės būdu. A: *TaqI* restrikcijos profilis: M – markeris GeneRuler 50 bp DNA Ladder; 1 – St; 2 – T; 3 – Pn; B: *HincII* restrikcijos profilis: M – markeris GeneRuler 100 bp Plus; 1 – St; 2 – T; 3 – Pn; C: *AccI* restrikcijos profilis: M – markeris GeneRuler 100 bp Plus; 1 – St; 2 – T; 3 – Pn; D: *BstUI* restrikcijos profilis: M – markeris GeneRuler 100 bp Plus; 1 – St; 2 – T; 3 – Pn.

Pagal gautus restrikcijos profilius, matome, kad Lietuvoje išskirtų St ir T izoliatų 1160 bp fragmentą *TaqI* ir *HincII* restrikcijos endonukleazės kerpa (3.7. pav. A ir B: 1 bei 2 takeliai), o *AccI* ir *BstUI* – nekerpa (3.7. pav. C ir D: 1 bei 2 takeliai), todėl šie izoliatai priklauso B tipui. Pn izoliatui buvo gauti priešingi rezultatai – *TaqI* ir *HincII* restrikcijos endonukleazės nekerpa 1160 bp fragmentą (3.7. pav. A ir B: 3 takelis), o *AccI* ir *BstUI* – kerpa (3.7. pav. C ir D: 3 takelis), todėl Pn izoliatas priklauso A tipui.

BNYVV tipų nustatymas daugybiniu AT-PCR metodu

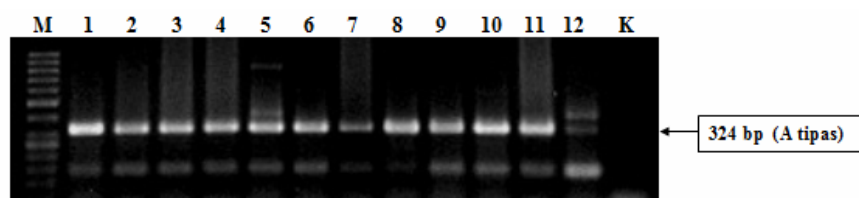
Daugybinė AT-PCR buvo atliekama dviem etapais. Pirmo etapo metu buvo vykdoma AT-PCR panaudojant specifinius pradmenis trigubo genų bloko (TGB) fragmento (722 bp) padauginimui. Antro etapo metu buvo vykdoma nPCR, panaudojant padaugintą TGB geno fragmentą ir dvi poras (A ir B tipui) specifinių pradmenų (Ratti ir kt., 2005). A tipo izoliatai turėtų amplifikuoti 324 bp produktą, B tipo – 178 bp produktą. 3.8. paveikslas iliustruoja TGB (3.8. pav. A) ir A/B tipo produktų (3.8. pav. B) amplifikaciją.



3.8. pav. Lietuvoje išskirtų izoliatų A/B tipų amplifikacijos produktai 2 % agarozės gelyje. A: TGB produktai: M – markeris GeneRuler 50 bp DNA Ladder; 1 – St; 2 – T; 3 – Pn; 4 – K–; B: A/B tipų produktai: M – markeris GeneRuler 50 bp DNA Ladder; 1 – St; 2 – T; 3 – Pn; 4 – K–.

Iš 3.8. B paveikslo matome, kad 1 ir 2 takelyje (St ir T izoliatai) susidarė 178 bp dydžio produktas, kuris būdingas B tipui, 3-jame takelyje (Pn izoliatas) susidarė 324 bp dydžio produktas, būdingas A tipui. Jokio amplifikacijos produkto nesudarė 4-ajame takelyje (sveikas *C. quinoa* augalas). Šie rezultatai patvirtina RFLP analizės rezultatus.

Daugybinės AT-PCR metodu taip pat buvo nustatyti ir Ukrainoje bei Kazachstane išskirtų BNYVV izoliatų tipai. 3.9. pav. iliustruoja Ukrainoje bei Kazachstane išskirtų BNYVV izoliatų antro daugybinės AT-PCR etapo (nPCR) A/B tipo produktų amplifikaciją.



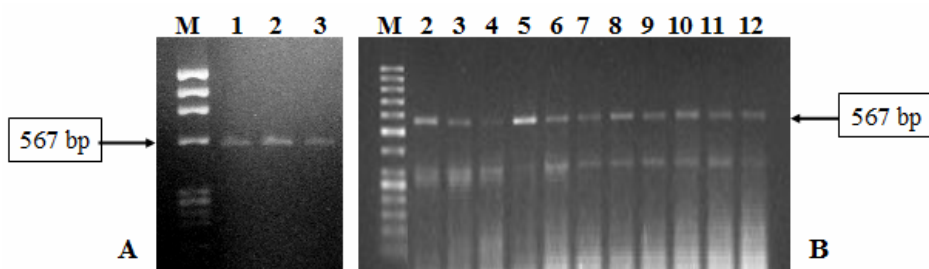
3.9. pav. Ukrainoje bei Kazachstane išskirtų izoliatų A/B tipų amplifikacijos produktai 2 % agarozės gelyje: M – markeris GeneRuler 50 bp DNA Ladder; 1–2 – ukr2; 3 – ukr3; 4 – ukr4; 5 – ukr5; 6 – ukr6; 7 – ukr7; 8 – ukr8; 9 – ukr9; 10 – ukr10; 11 – ukr11; 12 – kzt12; K – vandens kontrolė.

3.9. paveiksle matome, kad visuose takeliuose susidarė 324 bp dydžio produktai, todėl visus Ukrainoje bei Kazachstane išskirtus izoliatus pagal daugybinės AT-PCR metodą galima priskirti BNYVV A tipui.

3.4.2. BNYVV izoliatų apvalkalo baltymo geno analizė

Norint gauti daugiau informacijos apie tyrinėjamų BNYVV izoliatų skirtingumą bei patvirtinti jų nustatytus tipus, buvo pasirinkti specialūs pradmenys (Schirmer ir kt., 2005), amplifikuojantys CP geną (567 bp). RNR 2 5' proksimalinis ORF koduoja 21-kDa CP. Šis baltymas buvo pasirinktas analizei, nes 62, 103 ir 172 padėtyje turi svarbias aminorūgščių liekanas pagal kurias galima atskirti A tipo (T_{62} , S_{103} , L_{172}) izoliatų nuo B tipo (S_{62} , N_{103} , F_{172}) izoliatų (Kruse ir kt., 1994; Koenig ir kt., 1995; Miyanishi ir kt., 1999). Be to, pagal CP specifines aminorūgštis galima atskirti A tipo izoliatų nuo P tipo. Yra žinoma, kad A ir P tipai yra panašesni už B tipą (Koenig ir Lennefors, 2000; Meunier ir kt., 2005; Ratti ir kt., 2005; Schirmer ir kt., 2005). BNYVV A tipo izoliatų P21 aminorūgščių sekos turi daugiau panašumo su P tipo nei su B tipo izoliatais (97,9 palyginus su 95,2 %) (Koenig ir Lennefors, 2000). A tipo izoliatų, turinčių RNR 5 bei CP specifines aminorūgštis R_{17} ir I_{102} , galima pavadinti P tipo izoliatais (Koenig ir kt., 1995; Miyanishi ir kt., 1999).

CP geno padauginimui buvo naudojama viruso RNR, išskirta iš užkrėstų cukrinių runkelių šaknelių ir indikatorinių augalų, mechaniškai inokuliuotų BNYVV (Lietuvoje, Ukrainoje bei Kazachstane išskirti izoliatai). 3.10. paveikslas iliustruoja p21 geno AT-PCR produktus.



3.10. pav. CP geno amplifikacijos produktai 2 % agarozės gelyje. A (Lietuvoje išskirti izoliatai): M – markeris $\Phi\times 174$ DNA /BsuRI(Hae III); 1 – St; 2 – T; 3 – Pn; **B (Ukrainoje ir Kazachstane išskirti izoliatai):** M – markeris GeneRuler 50 bp DNA Ladder; 2 – ukr2; 3 – ukr3; 4 – ukr4; 5 – ukr5; 6 – ukr6; 7 – ukr7; 8 – ukr8; 9 – ukr9; 10 – ukr10; 11 – ukr11; 12 – kzt12.

Iš pateikto paveikslo matyti, kad visais atvejais buvo gautas specifinis BNYVV CP 567 bp produktas. Tai sutampa su tiesioginės DAS-IFA duomenimis. Gauti CP 567 bp produktai buvo išgryninti ir pateikti sekoskaitai. Sekoskaitos metodu gautos CP geno sekos buvo naudojamos filogenetinei analizei.

Aštuoniems izoliatams (Lietuvoje išskirtiems St, T, Pn; Ukrainoje išskirtiems ukr2, ukr9, ukr10, ukr11 ir Kazachstane išskirtam kzt12 izoliatams) buvo nustatyta CP geno nukleotidinė seka. Šešių izoliatų (St, T, ukr2, ukr9, ukr10, ukr11) CP geno seka (567 bp) buvo pilnai nustatyta, o likusių dviejų izoliatų (Pn ir kzt12) – tik dalinai. CP baltymo (188 aminorūgščių) seka buvo išvesta iš gautų nukleotidų sekų. Gautos nukleotidų ir aminorūgščių sekos buvo palygintos tarpusavyje bei su kitomis sekomis, gautomis iš genų banko duomenų bazės (3.5. lentelė).

CP nukleotidų ir aminorūgščių sekų identiškumas svyravo nuo 95 iki 100 %. Tyrinėtuose izoliatuose nebuvo nustatyta jokių nukleotidų skirtumų konservatyvioje geno srityje (*duomenys neparodyti*). Tačiau dviejų Lietuvoje išskirtų izoliatų (St ir T) nukleotidų sekos buvo identiškos. Identiškos nukleotidų sekos buvo ir tarp keturių Ukrainoje išskirtų (ukr2, ukr9, ukr10, ukr11) ir vieno Lietuvoje išskirto izoliato (Pn).

3.5. lentelė. Įvairių šalių BNYVV izoliatų CP geno sekų numeriai genų banko duomenų bazėje.

Šalis	Izoliatas	RNR 2 sekos numeris	BNYVV CP tipas	RNR 5 P26	Šaltinis
Austrija	A2	AY696072	A	-	Schirmer ir kt., 2005
	A4	AY696075	A	-	Schirmer ir kt., 2005
Belgija	Beauvechain	AJ634732	B	-	Meunier ir kt., 2005
	Mazy	AJ634736	B	-	Meunier ir kt., 2005
	Rutten	AJ634737	B	-	Meunier ir kt., 2005
	St Germain	AJ634738	B	-	Meunier ir kt., 2005
	Zetrud	AJ634741	B	-	Meunier ir kt., 2005
	B3	AY696079	B	-	Schirmer ir kt., 2005
	Illko.01	AY696099	B	-	Schirmer ir kt., 2005
	Illko.96	AY696102	B	-	Schirmer ir kt., 2005
	Beclers	AJ634733	A	-	Meunier ir kt., 2005

	B1-(2)	AY734492	A	-	Schirmer ir kt., 2005
Iranas	IR-GR	AM779752	A	P	Neskelbti duomenys
	Iran Fars	AY277887	A	n	Schirmer ir kt., 2005
Ispanija	S3	AY696110	A	-	Schirmer ir kt., 2005
	S4	AY696111	A	-	Schirmer ir kt., 2005
	S5	AY696112	A	-	Schirmer ir kt., 2005
	S10	AY696114	A	-	Schirmer ir kt., 2005
Japonija	SH1	AB018621	A	J	Miyaniishi ir kt., 1999
	S42	AB018622	A	J	Miyaniishi ir kt., 1999
	S12	AB018623	B	J	Miyaniishi ir kt., 1999
	S44	AB018624	B	J	Miyaniishi ir kt., 1999
	D104	AB018620	A	J	Miyaniishi ir kt., 1999
JAV	B2	AY696078	A	-	Schirmer ir kt., 2005
	A3	AY696074	A	-	Schirmer ir kt., 2005
	UF79	AJ810285	A	-	Lennefors ir kt., 2005
	1EU	AY696070	A	-	Schirmer ir kt., 2005
	412	AY696118	A	-	Schirmer ir kt., 2005
	S-89	AY771347	A	n	Neskelbti duomenys
Kazachstanas	Kas3	AF197556	A	P	Koenig ir Lennefors, 2000
Kinija	CY3	AB018625	B	J	Miyaniishi ir kt., 1999
	CH2	AB018626	B	J	Miyaniishi ir kt., 1999
	NM	S71490	B	-	Yao ir kt., 1993
	Yao 2	U25668	B	-	Yao ir kt., 1993
	Har2	EF473089	A	J	Li ir kt., 2008
	Hoh2	EF473092	B	J	Li ir kt., 2008
	Wu2	EF473095	A	J	Li ir kt., 2008
	Chan1	EF473099	B	J	Li ir kt., 2008
Lenkija	ZAcP	EU785964	A	n	Neskelbti duomenys
	JAcP	EU785963	A	n	Neskelbti duomenys
Nyderlandai	NL3	AY696105	A	-	Schirmer ir kt., 2005
Prancūzija	FC	AB018627	A	P	Miyaniishi ir kt., 1999
	FP	AB018628	A	P	Miyaniishi ir kt., 1999
	EP32A	AY696085	B	-	Schirmer ir kt., 2005
	EP38	AY696087	B	-	Schirmer ir kt., 2005
	C18-1	AY734493	B	-	Schirmer ir kt., 2005
	FP92	AJ810283	A	P	Lennefors ir kt., 2005
	F75	AF197547	A	P	Koenig ir Lennefors, 2000
	EP42	AY696089	A	+	Schirmer ir kt., 2005
	EP32B	AY696086	A	-	Schirmer ir kt., 2005
	Fb2	AY696094	B	-	Schirmer ir kt., 2005
	H4	AY696097	A	P	Schirmer ir kt., 2005

	F13	X04197	B	-	Bouzoubaa ir kt., 1986
Serbija ir Juodkalnija					
	A	AY920465	A	n	Neskelbti duomenys
Vokietija					
	G2	AY696096	B	-	Schirmer ir kt., 2005
	GT85	AJ810284	B	-	Lennefors ir kt., 2005
	OW1	EU864118	A	+	Koenig ir kt., 2008

A – A tipo CP; B – B tipo CP; P – P tipo P26 baltymas; J – Azijos tipo P26 baltymas, n – nenustatyta, „-“ nėra RNR 5, „+“ yra RNR 5.

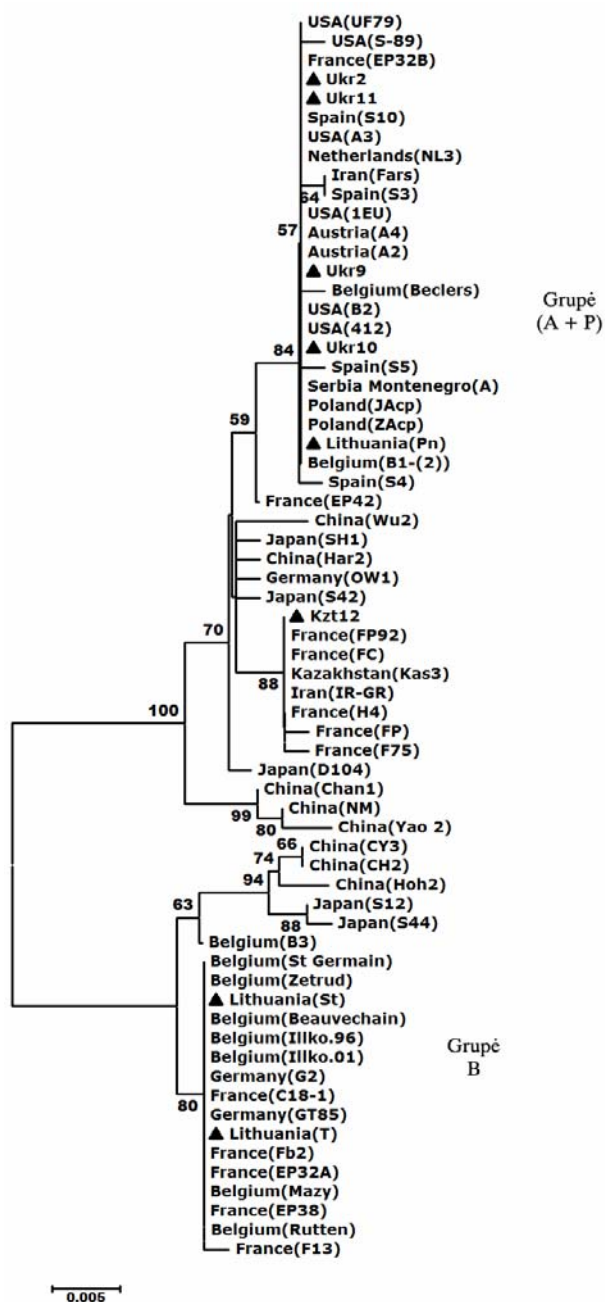
* Visi Kinijoje ir Japonijoje išskirti izoliatai RNR 5 p26 sekoje turi dvi delecijas 77 ir 227–229 padėtyje, europietiški – neturi, dėl to, Rytų Azijoje išskirti izoliatai yra J tipo (Koenig ir Lennefors, 2000; Li ir kt., 2008; Schirmer ir kt., 2005).

Tik labiausiai skirtingos nukleotidų sekos iš genų banko duomenų bazės buvo pasirinktos filogenetinio medžio sudarymui, kuris iliustruotas 3.11. paveiksle.

Filogenetinė CP geno analizė parodė, kad visi BNYVV izoliatai išsidėsto į dvi pagrindines grupes. Viena grupė apima A ir P tipo izoliatus (grupė A + P) bei mūsų tyrinėtus izoliatus ukr2, ukr9, ukr10, ukr11, kzt12 ir Pn. Kita grupė susideda iš B tipo izoliatų (B grupė) ir apima tyrinėtus St ir T izoliatus (3.11. pav.).

Remiantis ankstesniais tyrinėjimais (Kruse ir kt., 1994; Koenig ir kt., 1995; Miyanishi ir kt., 1999) A + P grupė ir B grupė gali būti atskirtos CP baltymo aminorūgščių skirtumais trijose padėtyse 62 (T į S), 103 (S į N) ir 172 (L į F). Europoje išskirti izoliatai, turintys RNR 5 yra priskiriami P tipui (Koenig ir kt., 1995), bet kitu požiūriu yra glaudžiai susiję su A tipu (Miyanishi ir kt., 1999).

Mūsų tyrinėtų BNYVV izoliatų aminorūgščių skirtumai CP baltyme pateikti 3.6. lentelėje.



3.11. pav. Filogenetinis BNYVV RNR 2 koduojamo CP geno sekų medis, sukonstruotas ClustalW ir MEGA 4.1 programomis, naudojant artimiausių grupių apjungimo metodą pagal 1000 medžių statistinio patikimumo analizę. Medžio šakų pavadinimai nurodo izoliato geografinę kilmę ir izoliato pavadinimą. (Sekų palyginimams naudotų izoliatų CP genų sekų numeriai iš genų banko duomenų bazės nurodyti 3.5. lentelėje). Šiame darbe nustatytos BNYVV izoliatų sekos pažymėtos ▲. Medžio skalė rodo filogenetinio panašumo indeksą (brūkšnys – 0,005 nukleotidų pasikeitimų vienoje padėtyje).

3.6. lentelė. Tyrinėtų BNYVV izoliatų aminorūgščių skirtumai apvalkalo baltyme.

Izoliatas	Šalis	Aminorūgšties padėtis P21 baltyme					BNYVV tipas
		17	62	102	103	172	
St	Lietuva	K	S	V	N	F	B
T	Lietuva	K	S	V	N	F	B
Pn	Lietuva	K	T	V	S	-	A
Ukr2	Ukraina	K	T	V	S	L	A
Ukr9	Ukraina	K	T	V	S	L	A
Ukr10	Ukraina	K	T	V	S	L	A
Ukr11	Ukraina	K	T	V	S	L	A
Kzt12	Kazachstanas	R	T	I	S	-	A(P*)

Aminorūgščių skirtumai, pagal kuriuos galima atskirti BNYVV tipą (A arba B), pažymėti tamsesnėmis raidėmis; „-“ – nenustatyta.

*P tipas pavadintas pagal R. Koenig ir kt., (1995) bei M. Miyanishi ir kt., (1999).

Filogenetinio CP geno medžio B grupė apima visus B tipo izoliatus iš Europos ir Azijos. Europoje išskirti BNYVV izoliatai RNR 5 neturi, o Azijoje išskirti izoliatai – turi. Šitai grupei priklauso mūsų tyrinėjami Lietuvoje išskirti izoliatai St ir T.

A + P grupė yra labai įvairi. Tyrinėjamo izoliato kzt12 CP geno seka buvo identiška Kas3 (Kazachstanas), FC, FP92, H4 (Prancūzija) ir IR-GR (Iranas) sekoms. Šie šeši izoliatai ir FP bei F75 (Prancūzija) izoliatai turi papildomą RNR 5, yra A tipo ir turi P tipui CP specifines aminorūgštis (R₁₇ ir I₁₀₂) (Koenig ir kt., 1995; Miyanishi ir kt., 1999), todėl juos galima pavadinti P tipo izoliatais.

Šiai A + P grupei taip pat galima priskirti Japonijoje (S42, SH1 ir D104), Kinijoje (Har2, Wu2 ir Chan1) ir Vokietijoje (OW1) išskirtus izoliatas, turinčius RNR 5 (Miyanishi ir kt., 1999; Koenig ir kt., 2008; Li ir kt., 2008). Visi Japonijoje ir Kinijoje išskirti izoliatai RNR 5 p26 sekoje turi dvi delecijas 77 ir 227–229 padėtyje, tuo tarpu Europoje išskirti izoliatai – neturi, dėl to Rytų Azijoje išskirti izoliatai yra J tipo, o Europoje išskirti – P tipo (Koenig ir Lennefors, 2000; Schirmer ir kt., 2005; Li ir kt., 2008). Vokietijoje išskirto (OW1) izoliato RNR 5 seka yra giminingesnė Rytų Azijoje išskirtų izoliatų sekoms, negu Europoje išskirtų izoliatų sekoms. Tai pirmas Vokietijoje išskirtas izoliatas, turintis RNR 5 (Koenig ir kt., 2008).

Visi kiti likę šioje grupėje yra A tipo BNYVV izoliatai, neturintys RNR 5, tarp kurių yra mūsų tyrinėjami izoliatai ukr2, ukr9, ukr10, ukr11 ir Pn (3.11. pav.).

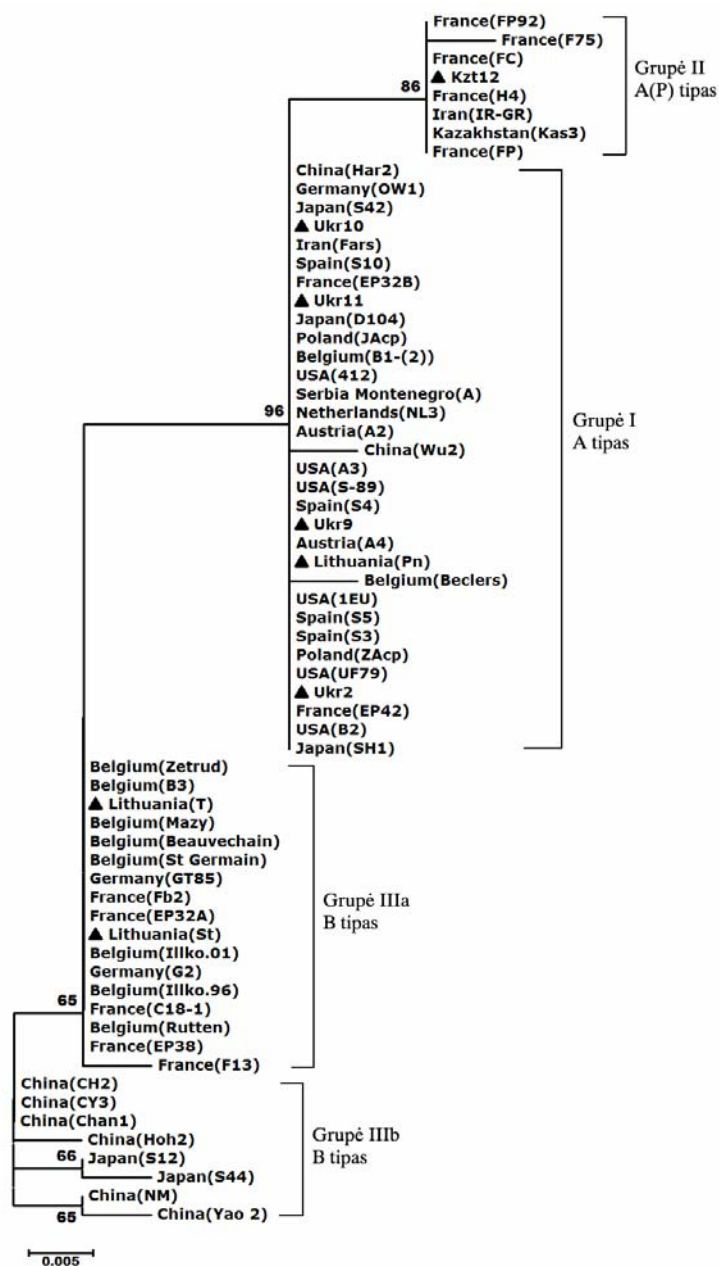
Įdomu tai, kad su A + P grupe yra glaudžiai susiję trys Kinijoje išskirti (NM, Yao2 ir Chan1) B tipo izoliatai (Yao ir kt., 1993; Li ir kt., 2008), nors jie aiškiai skiriasi nuo kitų izoliatų pagal filogenetinę CP nukleotidų sekos analizę.

Šiek tiek kitoks filogenetinio medžio vaizdas gautas lyginant BNYVV izoliatų CP baltymo aminorūgščių sekas (3.12. pav.).

Filogenetinis medis, sukonstruotas iš izoliatų daugybinio CP baltymo sekų suliginimo, parodo tris pagrindines grupes: dvi iš jų susijusios su A tipo (grupės I ir II) ir viena (grupė III) – su B tipo izoliatais. Jis tiksliau sugrupuoja BNYVV izoliatų negu nukleotidų sekų filogenetinis medis.

Grupėje I (3.12. pav.) BNYVV izoliatų CP sekos yra 100 % identiškios, nesvarbu iš kokios šalies jie bebūtų, išskyrus Belgijoje (Beclers) (Meunier ir kt., 2005) ir Kinijoje (Wu2) (Li ir kt., 2008) išskirtus izoliatų, kurie skiriasi nuo kitų A tipo izoliatų dėl S₃I ir F₁₆₈L pakeitimo atitinkamai. Šioje grupėje yra ir mūsų tyrinėti ukr2, ukr9, ukr10, ukr11 ir Pn izoliatai. Kai kurie šios grupės izoliatai turi RNR 5 (visi Rytų Azijoje, Vokietijoje OW1 ir Prancūzijoje EP42 išskirti izoliatai) (3.5. lentelė).

Panašiai ir grupėje II visos BNYVV CP sekos identiškios išskyrus Prancūzijoje išskirto (F75) izoliato, kuris skiriasi dėl L₄₁S pakeitimo. Šitoje grupėje yra ir mūsų tyrinėjamas izoliatas kzt12. RNR 5 turi visi šios grupės nariai. Čia nėra nei Kinijoje, nei Japonijoje išskirtų izoliatų, aptinkami tik Azijoje išskirti izoliatai iš Kazachstano (Koenig ir Lennefors, 2000) ir Irano. Šią grupę galima pavadinti P tipo izoliatų grupe, nes A tipo izoliatai, turintys RNR 5 bei CP specifines aminorūgštis R₁₇ ir I₁₀₂ padėtyse, vadinami P tipo izoliatais (Koenig ir kt., 1995; Miyanishi ir kt., 1999).



3.12. pav. Filogenetinis BNYVV RNR 2 koduojamo CP baltymo sekų medis, sukonstruotas ClustalW ir MEGA 4.1 programomis, naudojant artimiausių grupių apjungimo metodą pagal 1000 medžių statistinio patikimumo analizę. Medžio šakų pavadinimai nurodo izoliato geografinę kilmę ir izoliato pavadinimą. (Sekų palyginimams naudotų izoliatų CP genų sekų numeriai iš genų banko duomenų bazės nurodyti 3.5. lentelėje). Šiame darbe nustatytos BNYVV izoliatų sekos pažymėtos ▲. Medžio skalė rodo filogenetinio panašumo indeksą (brūkšnys – 0,005 aminorūgščių pasikeitimų vienoje padėtyje).

Grupė III yra įvairesnė, ji apima visus B tipo izoliatus, išskirtus Europoje ir Azijoje. Grupėje IIIa Europoje išskirti izoliatai neturi RNR 5. Čia įeina ir mūsų tyrinėjami Lietuvoje išskirti izoliatai St ir T. Tuo tarpu, Grupėje IIIb yra Azijoje išskirti izoliatai su RNR 5 (išskyrus Kinijoje išskirtus izoliatus NM ir Yao2). Šitai grupei priklauso NM, Yao2 ir Chan1 izoliatai, priešingai nei nukleotidų sekų filogenetinėje analizėje (3.11. pav.). Galiausiai, Prancūzijoje išskirtas izoliatas F13 skiriasi nuo grupės IIIa ir –b, dėl N₆₄S pakeitimo.

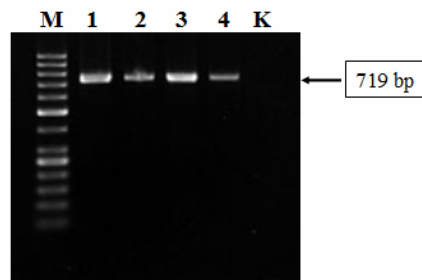
Atlikta CP baltymo sekų filogenetinė analizė patvirtino ir šiek tiek patikslino tyrinėtų BNYVV izoliatų tipus. Pagal CP baltymo sekų analizę Lietuvoje išskirti St ir T izoliatai priklauso B tipui, Lietuvoje išskirtas Pn ir visi Ukrainoje išskirti izoliatai (ukr2, ukr9, ukr10, ukr11) – A tipui, o Kazachstane išskirtas izoliatas (kzt12) – P tipui.

3.4.3. BNYVV RNR 3 koduojamo P25 baltymo filogenetinė analizė

BNYVV P25 baltymas yra atsakingas už viruso plitimą cukrinių runkelių šaknyse ir tipišką rizomanijos simptomų susidarymą (Tamada ir kt., 1989; Koenig ir kt., 1991; Tamada ir kt., 1999). Dėl to yra manoma, kad RNR 3 yra BNYVV patogeniškumo determinantas, o P25 yra atsakingas už sukeltus rizomanijos simptomus (Jupin ir kt., 1991; Chiba ir kt., 2008).

Didelis sekos kintamumas yra aptinkamas P25 baltymo srityje, ypač keturių aminorūgščių tetradoje (67–70 padėtyje). Tai ypač būdinga A tipo izoliatams (Schirmer ir kt., 2005; Yilmaz ir kt., 2007; Chiba ir kt., 2008; Koenig ir kt., 2008; Li ir kt., 2008). P25 baltymą sudaro 219 aminorūgščių. Svarbi aminorūgščių tetrada randasi žemiau už branduolio lokalizacijos signalo motyvo (Vetter ir kt., 2004) ir aukščiau už cinko pirštų motyvo (Jupin ir kt., 1992). Tetradų pakitimai gali turėti didelės įtakos P25 oligomerizacijai ir BNYVV patogeniškumui. Tai buvo parodyta eksperimentuose su *T. expansa* (Klein ir kt., 2007) ir dalinai atspariomis cukrinių runkelių veislėmis (Liu ir Lewellen, 2007; Acosta-Leal ir kt., 2008; Chiba ir kt., 2008).

BNYVV p25 geno identifikacijai buvo pasirinkti specifiniai PCR pradmenys, amplifikuojantys 719 bp produktą (Schirmer ir kt., 2005). Šio geno tyrimui buvo panaudoti trys Lietuvoje išskirti izoliatai ir vienas Ukrainoje išskirtas izoliatas. Parinkus specialias sąlygas, iš visų tyrinėtų izoliatų AT-PCR būdu buvo gautas specifinis 719 bp p25 geno amplifikacijos produktas (3.13. pav.).



3.13. pav. p25 geno amplifikacijos produktai 2 % agarozės gelyje: M – markeris GeneRuler 50 bp DNA Ladder; 1 – St; 2 – T; 3 – P; 4 – Ukr2; K – vandens kontrolė.

Gauti AT-PCR specifiniai produktai (719 bp) buvo išgryninti ir pateikti sekoskaitai. Sekoskaitos metodu gautos p25 geno sekos buvo naudojamos filogenetinei P25 baltymo sekų analizei ir palyginimui. Dviem izoliatams (St ir T) p25 geno seka (719 bp) buvo pilnai nustatyta, o kitiems dviems izoliatams (Pn ir ukr2) – tik dalinai. P25 baltymo (219 aminorūgščių) seka buvo išvesta iš gautų nukleotidų sekų.

P25 baltymo sekų tyrimai parodė, kad St ir T izoliatai 67–70 padėtyje turi AYHR, Pn – AHHG, o ukr2 – AYHG tetradą (3.7. lentelė).

3.7. lentelė. Tyrinėtų BNYVV izoliatų P25 aminorūgščių tetradą (67–70 padėtyje).

Izoliatas	Šalis	Aminorūgščių tetrada	BNYVV CP tipas
St	Lietuva	AYHR	B
T	Lietuva	AYHR	B
Pn	Lietuva	AHHG	A
Ukr2	Ukraina	AYHG	A

Pagal ankstesnę CP sekos palyginimą mūsų tiriami izoliatai priklauso A (Lietuvoje išskirtas Pn ir Ukrainoje išskirti izoliatai) ir B (Lietuvoje išskirti St ir T izoliatai) tipams. Daugybiniis P25 baltymo aminorūgščių sekos palyginimas parodė, kad Lietuvoje išskirtų B tipo izoliatų P25 baltymo sekos buvo panašiausios su Belgijoje ir Vokietijoje išskirtų B tipo izoliatų sekomis. A tipo izoliatų (ukr2 ir Pn) sekos panašiausios su Belgijoje, Prancūzijoje ir Šveicarijoje išskirtų A tipo izoliatų sekomis. Sekų palyginimams naudotų izoliatų p25 genų sekų numeriai iš genų banko duomenų bazės nurodyti 3.8. lentelėje.

3.8. lentelė. Įvairių šalių BNYVV RNR 3 p25 geno sekų numeriai genų banko duomenų bazėje.

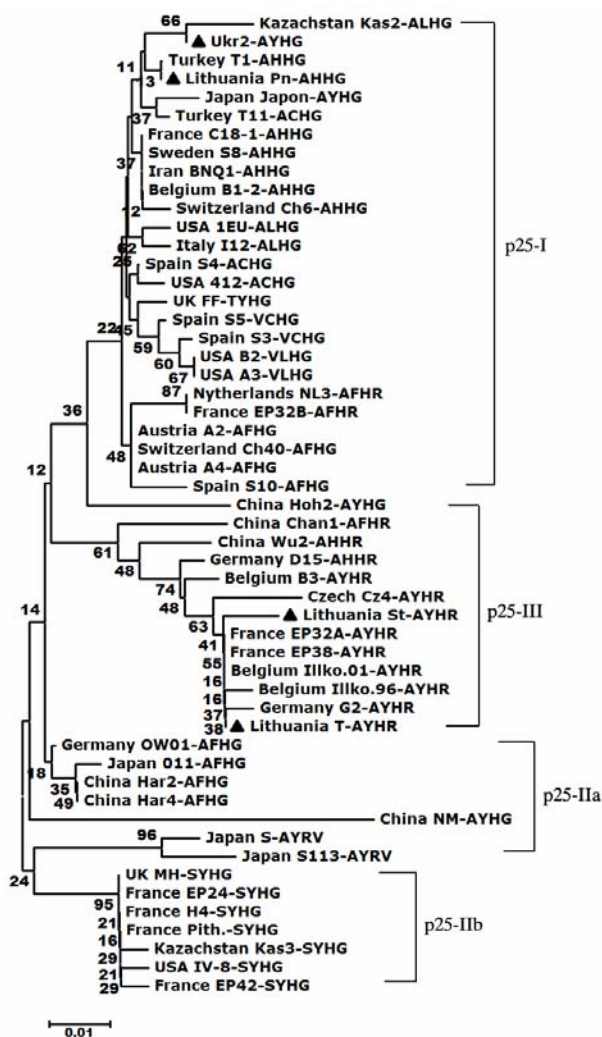
Šalis	Izoliatas	RNR3 sekos numeris	Aminorūgščių tetrada 67-70 padėtyje	BNYVV CP genotipas	Šaltinis
Austrija	A2	AY696123	AFHG	A tipas	Schirmer ir kt., 2005
	A4	AY696126	AFHG	A tipas	Schirmer ir kt., 2005
Belgija	B3	AY696130	AYHR	B tipas	Schirmer ir kt., 2005
	Illko.01	AY696158	AYHR	B tipas	Schirmer ir kt., 2005
	Illko.96	AY696161	AYHR	B tipas	Schirmer ir kt., 2005
	B1-(2)	AY734498	AHHG	A tipas	Schirmer ir kt., 2005
Čekija	Cz4	DQ462121	AYHR	B tipas	Ward ir kt., 2007
Iranas	BNQ1	AY703454	AHHG	A tipas	Neskelbti duomenys
Ispanija	S3	AY696169	VCHG	A tipas	Schirmer ir kt., 2005
	S4	AY696170	ACHG	A tipas	Schirmer ir kt., 2005
	S5	AY696171	VCHG	A tipas	Schirmer ir kt., 2005
	S10	AY696173	AFHG	A tipas	Schirmer ir kt., 2005
Italija	I12	AF197551	ALHG	A tipas	Koenig ir Lennefors, 2000
Japonija	S	D84412	AYRV	A tipas	Saito ir kt., 1996
	O11	AB207805	AFHG	A tipas	Chiba ir kt., 2008
	Japon	AY696163	AYHG	A tipas	Schirmer ir kt., 2005
	S113	AB207806	AYRV	A tipas	Chiba ir kt., 2008
JAV	B2	AY696078	VLHG	A tipas	Schirmer ir kt., 2005
	A3	AY696125	VLHG	A tipas	Schirmer ir kt., 2005

	1EU	AY696119	ALHG	A tipas	Schirmer ir kt., 2005
	412	AY696121	ACHG	A tipas	Schirmer ir kt., 2005
	IV-8	DQ415513	SYHG	A tipas	Neskelbti duomenys
Jungtinė Karalystė					
	FF	DQ440513	TYHG	A tipas	Ward ir kt., 2007
	MH	DQ440512	SYHG	A(P) tipas	Ward ir kt., 2007
Kazachstanas					
	Kas2	AF197553	ALHG	A(P)tipas	Koenig ir Lennefors, 2000
	Kas3	DQ462126	SYHG	A(P)tipas	Ward ir kt., 2007
Kinija					
	NM	AJ239200	AYHG	B tipas	Li ir kt., 1998
	Har2	EF473100	AFHG	A tipas	Li ir kt., 2008
	Har4	EF473101	AFHG	A tipas	Li ir kt., 2008
	Hoh2	EF473103	AYHG	B tipas	Li ir kt., 2008
	Wu2	EF473108	AHHR	A tipas	Li ir kt., 2008
	Chan1	EF473110	AFHR	B tipas	Li ir kt., 2008
Nyderlandai					
	NL3	AY696164	AFHR	A tipas	Schirmer ir kt., 2005
Prancūzija					
	EP32A	AY696136	AYHR	B tipas	Schirmer ir kt., 2005
	EP38	AY696140	AYHR	B tipas	Schirmer ir kt., 2005
	EP42	AY696143	SYHG	A(P)tipas	Schirmer ir kt., 2005
	EP32B	AY696137	AFHR	A tipas	Schirmer ir kt., 2005
	H4	AY696156	SYHG	A(P) tipas	Schirmer ir kt., 2005
	C18-1	AY734499	AHHG	A tipas	Schirmer ir kt., 2005
	Pith.	AY734505	SYHG	A(P) tipas	Schirmer ir kt., 2005
	EP24	AY696134	SYHG	A(P) tipas	Schirmer ir kt., 2005
Švedija					
	S8	EU330454	AHHG	A tipas	Koenig ir kt., 2008
Šveicarija					
	Ch40	EU770694	AFHG	A tipas	Koenig ir kt., 2008
	Ch6	DQ462118	AHHG	A tipas	Ward ir kt., 2007
Turkija					
	T1	AY772230	AHHG	A tipas	Yilmaz ir kt., 2007
	T11	AY772234	ACHG	A tipas	Yilmaz ir kt., 2007
Vokietija					
	G2	AY696155	AYHR	B tipas	Schirmer ir kt., 2005
	OW01	EU770693	AFHG	A tipas	Koenig ir kt., 2008
	D15	DQ462122	AHHR	B tipas	Ward ir kt., 2007

A – A tipo; B – B tipo; (A)P – P tipo izoliatai.

* Europietiški izoliatai, turintys RNR 5 yra priskiriami P tipui (Koenig ir kt., 1995), bet kitu požiūriu yra glaudžiai susiję su A tipu (Miyamishi ir kt., 1999).

Tik labiausiai skirtingomis sekomis pasižymintys izoliatai iš genų banko duomenų bazės buvo pasirinkti filogenetinio medžio sudarymui, kuris iliustruotas 3.14. paveiksle.



3.14 pav. Filogenetinis BNYVV RNR 3 koduojamo P25 baltymo sekų medis, sukonstruotas ClustalW ir MEGA 4.1 programomis, naudojant artimiausių grupių apjungimo metodą pagal 1000 medžių statistinio patikimumo analizę. Pavadinimai nurodo izoliato geografinę kilmę ir izoliato pavadinimą. (Sekų palyginimams naudotų izoliatų p25 genų sekų numeriai iš genų banko duomenų bazės nurodyti 3.8. lentelėje). Šiame darbe nustatytos BNYVV izoliatų sekos pažymėtos ▲. Baltymo p25 aminorūgščių tetrada atskirta brūkšneliu. Medžio skalė rodo filogenetinio panašumo indeksą (brūkšnys – 0,01 aminorūgščių pasikeitimų vienoje padėtyje).

Dvi filogenetinio P25 baltymo medžio grupės (grupė p25-I ir -II) yra susijusios su BNYVV A tipo ir viena (grupė p25-III) – su B tipo izoliatais (3.14. pav.), tai atitinka A. Schirmer ir kt. (2005) pateiktą BNYVV izoliatų P25 baltymo filogenetinio medžio analizę.

Pagal P25 baltymo filogenetinio medžio analizę, du B tipo izoliatai (Lietuvoje išskirti St ir T) priklauso p25-III grupei kartu su B tipo izoliatais, turinčiais AYHR tetradą, išskirtais Belgijoje, Vokietijoje, Prancūzijoje ir Čekijoje (3.14. pav.). Tai atitinka A. Schirmer ir kt. (2005) nustatytą europietišku izoliatų koreliaciją tarp CP, P25 ir RNR 5, kurioje A tipo CP izoliatai turi kintamus P25 tetrados motyvus ir dažniausiai neturi RNR 5 komponento; B tipo CP izoliatai turi pastovų tetrados motyvą AYHR ir neturi RNR 5; P tipo CP izoliatai turi SYHG tetradą ir RNR 5 (P-tipo p26) (Schirmer ir kt., 2005).

Įdomu, kad šiai p25-III grupei priklauso Vokietijoje išskirtas BNYVV izoliatas D15 su AHHR tetradą ir Kinijoje išskirti izoliatai, vienas iš kurių (Wu2) priklauso A tipui su AHHR tetradą, o kitas – B tipui (Chan1) su AFHR tetradą. Kinijoje išskirti izoliatai neturi jokių koreliacijos atsikartojimų tarp CP, P25 ir RNR 5, panašiu į A. Schirmer ir kt. (2005) nustatytą europietiškiems izoliatams koreliaciją. Kinijoje ir Japonijoje išskirti izoliatai, turintys RNR 5 (J-tipo p26), yra susiję su A ir B tipo CP izoliatais ir turi kintamą P25 tetrados motyvą. Dėl to Rytų Azijoje išskirti izoliatai gali turėti bendrą kilmę (Miyanishi ir kt., 1999; Li ir kt., 2008).

Tuo tarpu, Vokietijoje išskirtas D15 izoliatas yra „nukrypęs“ B tipo izoliatas, nes sekoje turi tyliąją (*angl.* silent) mutaciją 306 (g→a), 354 (c→t) ir 642 (t→c) nukleotidų padėtyse, todėl koduoja P25 su AHHR tetradą. BNYVV B tipo izoliatai, turintys AHHR, buvo taip pat išskirti ir Šveicarijoje (Koenig ir kt., 2008).

Tyrinėtų A tipo izoliatų (Pn ir ukr2) P25 baltymo sekos filogenetinė analizė parodė, kad jie priklauso p25-I grupei (3.14. pav.). Grupė p25-I apima daugiausiai A tipo izoliatus (Austrijoje, Šveicarijoje, Ispanijoje, Nyderlanduose, Prancūzijoje, Italijoje, Kazachstane, Belgijoje, Irane, Jungtinėje Karalystėje, Švedijoje, Turkijoje, JAV ir Japonijoje išskirtus izoliatus) ir vieną B tipo Kinijoje išskirtą (Hoh2) izoliatą. Čia galima rasti devynias tetradas iš trylikos. Kai kurie izoliatai turi RNR 5 (Kas2 ir Japon).

Tyrinėti izoliatai nebuvo priskirti p25-II grupei, kuri yra skirstoma į du pogrupius: p25-IIa ir p25-IIb.

p25-IIb grupė pasižymi tuo, kad apima tik A tipo izoliatų, kurie ekspresuoja P25 su unikalia SYHG tetradą ir turi RNR 5. Šiai grupei priklauso beveik visi Europoje išskirti P tipo izoliatai (Prancūzija, Jungtinė Karalystė), Kazachstane išskirtas P tipo (Kas3) ir Amerikoje išskirtas A tipo izoliatas. p25-IIa grupė apima A tipo Japonijoje išskirtus izoliatų dažniausiai turinčius AYRV tetradą, išskyrus vieną izoliatą (O11) su AFHG tetradą. Dauguma čia esančių izoliatų turi RNR 5 (išskyrus Japonijoje išskirtus izoliatų O11 ir S113 bei Kinijoje išskirtas – NM). Taip pat šiai grupei priklauso Vokietijoje išskirtas izoliatas OW01 su AFHG tetradą. Šis izoliatas pasižymi tuo, kad jo seka yra giminingesnė Rytų Azijoje išskirtų izoliatų sekoms, negu Europoje išskirtų BNYVV izoliatų P25 sekoms (Koenig ir kt., 2008).

Įdomu, kad Kinijoje išskirti Hoh2 ir NM izoliatai yra priskiriami p25-I ir p25-IIa grupėms su A tipo izoliatais, nors šie izoliatai turi B tipo CP. Taip pat A tipo izoliatas Wu2 grupuojamas su p25-III grupe, turinčia B tipo izoliatų. Tai rodo, kad šie izoliatai atstovauja natūralų persirūšavimą, susidariusį dėl RNR 3 apsisikeitimų tarp izoliatų su A ir B tipo CP (Li ir kt., 2008).

P25 sekos variacijos gali turėti įtakos BNYVV izoliatų patogeniškumui. RNR 3 kintamumas gali sumažinti atsparumą dalinai atspariose cukrinių runkelių veislėse (Schirmer ir kt., 2005; Klein ir kt., 2007).

Pagal P25 baltymo sekų filogenetinę analizę Lietuvoje išskirti BNYVV St ir T izoliatai priklauso B tipo izoliatams, turintiems AYHR tetradą, Lietuvoje išskirtas Pn – A tipo su AHHG ir Ukrainoje išskirtas ukr2 – A tipo su AYHG tetradą izoliatams. Tai atitinka A. Schirmer ir kt. (2005) nustatytą BNYVV izoliatų koreliaciją tarp CP, P25 ir RNR 5.

3.5. Kitų runkelius pažeidžiančių virusų, susijusių su rizomanija, aptikimas

Trys virusai – BNYVV, BSBV ir BVQ yra pernešami tuo paties *P. betae* pernešėjo. Nors dviejų pomovirusų (BSBV ir BVQ) įtaka rizomanijos infekcijoje lieka debatų lygyje, neretai rizomanijos užkrėstuose pasėliuose jie kartu su BNYVV randami cukrinių runkelių šaknyse (Prillwitz ir Schlösser, 1992; Meunier ir kt., 2003). Buvo įdomu patikrinti, ar šie virusai kartu bus išskirti ir mūsų tiriamuosiuose izoliatuose.

BNYVV ir BSBV buvo aptinkami tiesioginės DAS-IFA ir tiesioginės TAS-IFA metodais atitinkamai. Kadangi BVQ aptikimui imunofermentinio rinkinio neturėjome, šio viruso detekcija buvo pasikliaujama daugybine AT-PCR, leidžiančia vienu metu iš karto identifikuoti BNYVV, BSBV ir BVQ.

Lietuvoje surinktuose mėginiuose (St, T, Pn) nebuvo aptikta BNYVV ir BSBV mišinio (*neparodyti duomenys*). Tuo tarpu šie virusai buvo aptikti kartu kai kuriuose izoliatuose, išskirtuose Ukrainoje ir Kazachstane. BSBV identifikacija buvo atliekama tiek IFA, tiek daugybinės AT-PCR metodais.

BSBV nustatymui TAS-IFA metodu buvo atrinkti tik tie izoliatai, kuriuose prieš tai buvo identifikuotas BNYVV. Teigiamai įvertinami buvo tie mėginiai, kurių optinis tankis 3 ar daugiau kartų didesnis už neigiamą kontrolę (Clark ir Adams, 1977). Gauti IFA rezultatai pateikiami 3.9. lentelėje.

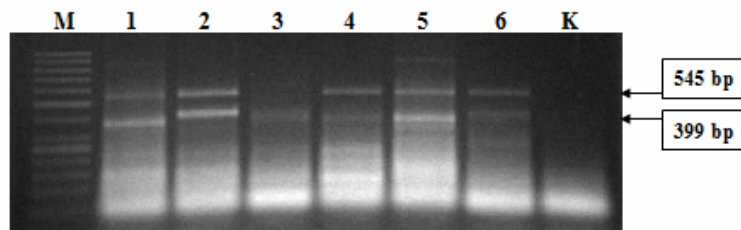
Pagal TAS-IFA rezultatus, BSBV buvo aptiktas ukr2, ukr4, ukr9, ukr10, ukr11 ir kzt12 izoliatuose (3.9. lentelė).

BSBV identifikacija buvo patvirtinta ir daugybinės AT-PCR metodu. Šios reakcijos metu buvo naudojamos iš karto trys specifinių PCR pradmenų poros (Meunier ir kt., 2003), amplifikuojančios 291 bp (BVQ), 399 bp (BSBV) ir 545 bp (BNYVV) produktus (3.15. pav.).

3.9. lentelė. BNYVV ir BSBV mišrios infekcijos tyrimo IFA rezultatai.

Mėginiai	Virusinė infekcija	
	BNYVV	BSBV
	DAS-IFA, Absorbcija, 405 nm	TAS-IFA, Absorbcija, 405 nm
Ukr2	0,586 +	0,458 +
Ukr3	0,561 +	0,27 –
Ukr4	0,848 +	0,342 +
Ukr5	1,011 +	0,249 –
Ukr6	0,452 +	0,253 –
Ukr7	0,451 +	0,278 –
Ukr8	0,466 +	0,288 –
Ukr9	0,674 +	0,423 +
Ukr10	0,705 +	0,345 +
Ukr11	0,843 +	0,512 +
Kzt12	0,893 +	0,654 +
K–	0,151	0,176
K+	1,65	2,408

„K–“ – neigiama kontrolė; „K+“ – teigiama kontrolė; „–“ – neigiamas rezultatas; „+“ – teigiamas rezultatas.



3.15. pav. Daugybinės AT-PCR produktai 2 % agarozės gelyje: M – markeris GeneRuler 50 bp DNA Ladder; 1 – ukr2; 2 – ukr4; 3 – ukr9; 4 – ukr10; 5 – ukr11; 6 – kzt12; K – vandens kontrolė.

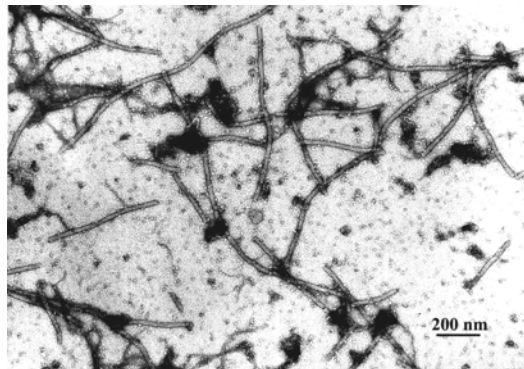
3.15. paveiksle matosi AT-PCR metu susidarę BSBV (399 bp) ir BNYVV (545 bp) specifiniai produktai. Daugybinė AT-PCR patvirtino BNYVV ir BSBV mišrios infekcijos tyrimo IFA rezultatus. Nei viename pavyzdyje nebuvo aptiktas BVQ.

3.6. Imunodiagnostinės sistemos naudojant krienų peroksidazę paruošimas BNYVV aptikimui

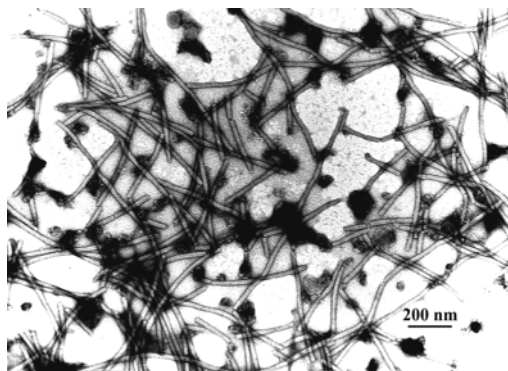
3.6.1. BNYVV gryninimas ir koncentravimas

BNYVV gryninimas buvo atliekamas pagal šiek tiek modifikuotą Bouzoubaa (1998) metodiką. Sveiko augalo ekstraktas buvo naudojamas kaip neigiama kontrolė. Virusas buvo koncentruojamas du kartus naudojant polietilenglikolį (PEG-6000) ir NaCl. Vėliau BNYVV gryninimui buvo naudojama didelio greičio ultracentrifugavimas ant 20 % sacharozės „pagalvėlės“ bei tankio gradientinis centrifugavimas 5-45 % sacharozės tirpale. BNYVV valymo, koncentravimo ir gryninimo etapuose virusinis preparatas buvo tiriamas EM. 3.16.-3.18. paveiksluose yra pateiktos BNYVV gryninimo etapų EM nuotraukos.

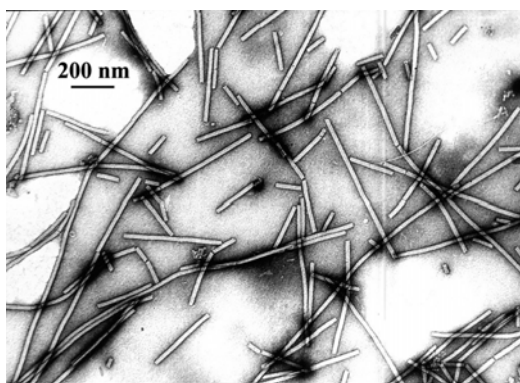
Išgryninta viruso suspensija buvo nagrinėjama EM ir imunobloto metodu (Žižytė ir Staniulis, 2007b). Išgryninto virusinio preparato EM (3.18. pav.) parodė tiesios lazdelių formos virusines daleles, būdingas rizomanijos sukėlėjui (Richards ir Tamada, 1992; Fauquet ir kt., 2005).



3.16. pav. EM nuotrauka (padidinimas 20000 ×): BNYVV dalelės po nusodinimo PEG.



3.17. pav. EM nuotrauka (padidinimas 25000 ×): BNYVV dalelės po I ultracentrifugavimo ant 20 % sacharozės „pagalvėlės“.



3.18. pav. EM nuotrauka (padidinimas 20000 ×): išgrynintos BNYVV dalelės.

Buvo įvertinta šio preparato koncentracija ir išeiga. Virusų koncentracijai įvertinti buvo matuojamas virusinio preparato absorbcijos spektras 240, 260 ir 280 nm bangos ilgiuose. Matuojant ultravioletinės šviesos sugertį, nustatomas virusų dalelėse esantis nukleorūgščių kiekis, o pagal sugebėjimą išbarstyti matomą šviesą apytiksliai įvertinama virusų suspensijos koncentracija. BNYVV koncentracija buvo nustatyta pagal formulę:

$$C \text{ (mg/ml)} = OD_{260} \times \text{skiedimas}/3,2;$$

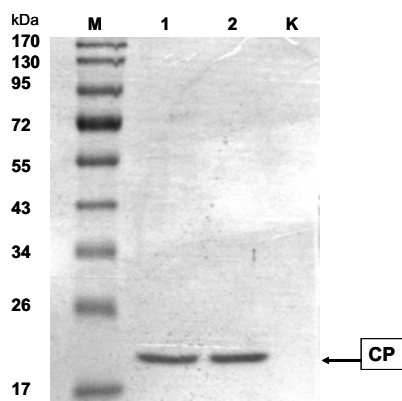
kur skaičius 3,2 yra viruso ekstinkcijos koeficientas (Putz ir Kuszala, 1978; Bouzoubaa, 1998).

Įvertinus virusinio preparato absorbcijos spektrą, buvo apskaičiuota, jog gauta viruso išeiga 0,237-0,515 mg iš 100 g infekuotos augalinės medžiagos.

3.6.2. Viruso apvalkalo baltymo analizė

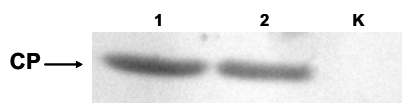
Išgrynintas BNYVV preparatas buvo panaudotas viruso apvalkalo baltymo analizei imunobloto metodu (Žižytė ir Staniulis, 2007b). Tai yra baltymo aptikimas elektroforetiškai iš išgrynintos viruso suspensijos, naudojant denatūruojančias sąlygas, bei specifinio baltymo identifikavimas iš baltymų mišinio, naudojant atitinkamus antikūnus prieš virusą. Imunobloto metodu galima identifikuoti virusą pagal dvi nepriklausomas apvalkalo baltymo savybes – molekulinę masę ir serologinį specifiškumą (Matthews, 1991).

Išgryninto BNYVV preparato baltymų natrio dodecilsulfato-poliakrilamidinė gelio elektroforezė (NDS-PAGE) buvo atliekama pagal U. K. Laemmli (1970) metodiką vertikaliame aparate, naudojant 4 % koncentruojamąjį bei 12 % skiriamąjį gelius. Gautas BNYVV baltymų elektroforezės vaizdas pateikiamas 3.19. paveiksle.



3.19. pav. Baltymų elektroforezinis vaizdas: M – baltyminis markeris PageRuler Prestained protein Ladder; 1-2 – išgrynintas BNYVV preparatas; K – kontrolė, ekstraktas iš sveiko *C. quinoa* augalo.

Yra žinoma, kad BNYVV apvalkalo baltymo molekulinė masė yra ~21 kDa dydžio (Putz, 1977). Išgrynintos BNYVV suspensijos NDS-PAGE (3.19. pav.) ir imunobloto analizė (3.20. pav.) parodė vieną juostelę, ~21 kDa dydžio BNYVV apvalkalo baltymą.



3.20. pav. BNYVV apvalkalo baltymo imunoblotas. 1-2 – išgrynintas BNYVV preparatas; K – kontrolė, ekstraktas iš sveiko *C. quinoa* augalo.

Imunoblote BNYVV antiserumas reagavo tik su išgryninto BNYVV apvalkalo baltymu ir nereagavo su jokiais sveiko augalo *C. quinoa* ekstrakto baltymais (3.20. K takelis pav.).

Šie rezultatai dar kartą patvirtina BNYVV identifikaciją. Tokiu būdu, išgryninta virusinė medžiaga buvo panaudota antikūnų gavimui, akonjugacijai su fermentu bei taikoma BNYVV diagnostikai (Žižytė ir kt., 2009).

3.6.3. Polikloninių antikūnų gavimas

BNYVV polikloniniai antikūnai (p-ak) buvo gauti po triušio imunizacijos. Pirmajam triušio imunizavimui buvo panaudota 0,34 mg, antrajam – 0,2 mg, o trečiajam – 0,05 mg išgryninto virusinio preparato. Triušio kraujas buvo paimtas 3-ią dieną po paskutinio intraveninio virusinio antigeno suleidimo. Po kraujo apdorojimo antikūnų išsodinimui buvo naudojamas sotas (50 %) amonio sulfato tirpalas. Gauti ak buvo supilti į sterilius mėgintuvėlius ir saugomi 4° arba -20° C.

Gautų p-ak specifiškumas buvo patikrintas netiesioginės IFA metodu titravimo būdu (3.10. lentelė). Ak titru buvo laikomas toks antikūnų praskiedimas IFA, kuriame optinis tankis lygus vienetui. Gautų BNYVV p-ak titras buvo 1:1600 (3.10. lentelė).

3.10. lentelė. BNYVV polikloninio antiserumo titras netiesioginėje IFA

Titravimas	Absorbicija, 450 nm bangos ilgyje*
1:200	1,842 (0,048)
1:400	1,669 (0,048)
1:800	1,330 (0,048)
1:1600	0,969 (0,048)
1:3200	0,596 (0,048)
1:6400	0,518 (0,048)
1:12800	0,340 (0,048)
1:25600	0,258 (0,048)
1:51200	0,187 (0,048)
1:102400	0,113 (0,048)

*absorbicijos vidurkis apskaičiuotas iš dviejų išmatuotų šulinėlių. Skliausteliuose nurodyta neigiamos kontrolės reikšmė.

3.6.4. Serologinė polikloninių antikūnų analizė

Imunodiagnostinei sistemai sukurti, p-ak buvo konjuguoti su krienų peroksidaze (HRP). Gauti HRP antikūnų konjugatai buvo taip pat patikrinti titravimo būdu tiesioginės IFA metodu. Nustatytas gauto p-ak-BNYVV HRP konjugato titras buvo 1:400 (3.11. lentelė).

3.11. lentelė. p-ak-BNYVV HRP konjugato titras tiesioginėje IFA

Titravimas	Absorbicija, 450 nm bangos ilgyje*
1:100	1,329 (0,007)
1:200	1,040 (0,007)
1:400	0,954 (0,007)
1:800	0,593 (0,007)
1:1600	0,330 (0,007)
1:3200	0,165 (0,007)
1:6400	0,105 (0,007)

*absorbicijos vidurkis apskaičiuotas iš dviejų išmatuotų šulinėlių. Skliausteliuose nurodyta neigiamos kontrolės reikšmė.

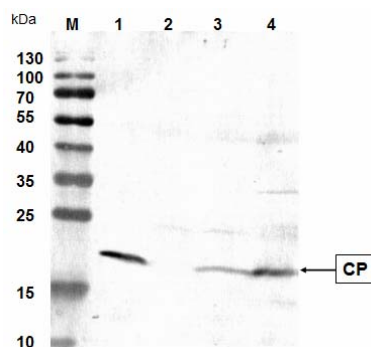
Taip pat buvo nustatyta, kad tiesioginės IFA metodu, panaudojus pagamintą p-ak-BNYVV HRP konjugato tirpalą (praskiedimas 200k) su skirtingo praskiedimo išgryninto viruso suspensija (pradinė virusinės suspensijos koncentracija 10 µg/ml), galima aptikti BNYVV 0,3 – 0,15 µg/ml intervale.

Nustatytas testuojamų p-ak Ig kiekis buvo 5 mg. IFA sistemoje pakankamas antigeno kiekis yra 5 µg, todėl norint panaudoti gautus p-ak, jų

kiekis IFA sistemoje turėtų būti toks pats kaip ir antigeno – 5 µg. Todėl tokioje sistemoje reikėtų naudoti apie 1000k praskiestą p-ak tirpalą.

Naudojant nustatytą optimalų p-ak (1:1000) ir optimalų p-ak-BNYVV HRP konjugato (1:300) praskiedimą, galime gautus p-ak ir p-ak-BNYVV HRP konjugatą panaudoti BNYVV diagnostikoje. Tokia sudaryta BNYVV diagnostikos sistema gali būti tinkama imunofermentinei analizei ir imunoblotui.

BNYVV diagnostikos sistemą patvirtino imunoblotas, kuriame buvo analizuojami augaliniai mėginiai, užkrėsti BNYVV. Taip pat imunobloto metodu buvo patikrintas gautų antikūnų specifiškumas. Išgryninto viruso preparatas buvo naudojamas kaip teigiama kontrolė, o sveiko augalo audinys – kaip neigiama kontrolė (3.21. ir 3.22. pav.).

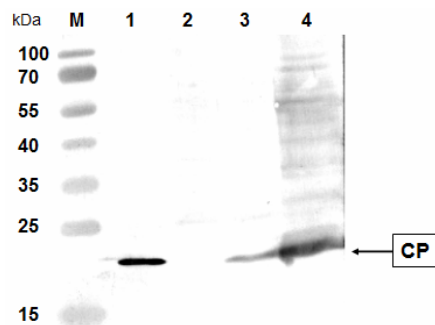


3.21. pav. BNYVV apvalkalo baltymo imunoblotas su pagamintu p-ak-BNYVV HRP konjugatu: M – baltyminis markeris PageRuler Prestained protein Ladder; 1– išgryninta viruso suspensija; 2 – neigiama kontrolė; 3-4 – augalų mėginiai, užkrėsti BNYVV.

Panaudojus pagamintą p-ak-BNYVV HRP konjugatą, praskiestą 300k, BNYVV apvalkalo baltymo imunoblotas parodė vieną juostelę, atitinkančią BNYVV CP išgryninto viruso suspensijoje (3.21. pav. 1 takelis) ir rizomanija infekuotuose augaliniuose mėginiuose (3.21. pav. 3 ir 4 takeliai).

Kitas imunoblotas buvo atliekamas su gautais p-ak. Panaudojus testuojamus p-ak, praskiestus 1000k, su komerciniais antriniais antikūnais (skiedimas 1:30000 pagal gamintojų rekomendacijas), konjuguotais šarminė

fosfotaze, BNYVV apvalkalo baltymo imunoblotas taip pat parodė vieną juostelę, atitinkančią BNYVV CP (3.22. pav.).



3.22. pav. BNYVV apvalkalo baltymo imunoblotas su gautais polikloniniais ak: M – baltyminis markeris PageRuler Prestained protein Ladder; 1 – išgryninta viruso suspensija; 2 – neigiama kontrolė; 3-4 – augalų mėginiai, užkrėsti BNYVV.

p-ak ir p-ak-BNYVV HRP konjugatas nereagavo su jokiais sveiko augalo *C. quinoa* (neigiama kontrolė) baltymais (3.21. ir 3.22. pav. 2 takelis).

Taigi, išgryninta viruso suspensija buvo panaudota polikloninio antiserumo gavimui, kuris galėtų būti taikomas BNYVV diagnostikoje IFA ir imunobloto metodais. Imunofermentinės sistemos sukūrimui buvo naudojamas fermentas krienų peroksidazė. Tokia gauta sistema leido išskirti BNYVV 0,3–0,15 µg/ml ribose ir buvo patvirtinta imunobloto metodu.

3.7. Rezultatų apibendrinimas

Rizomanija yra dirvožemiu plintanti cukrinių runkelių liga, paplitusi pagrindiniuose pasaulio cukrinių runkelių auginimo regionuose, lemianti didelius derliaus nuostolius. Liga yra sunkiai kontroliuojama. Taigi, yra svarbu izoliuoti ir charakterizuoti cukriniuose runkeliuose rizomanijos infekciją sukeltantį virusą, siekiant užkirsti kelią tolimesniam jo plitimui bei daromai žalai.

Lietuvoje auginamų cukrinių runkelių plotas siekia daugiau kaip 20000 hektarų. Žinant BNYVV daromą žalą cukriniams runkeliams, jau nuo 1998 m. Lietuvoje buvo atliekami tyrimai, siekiant išskirti rizomaniją, naudojant DAS-

IFA metodą. Tik 2004 metais buvo aptikta pirmoji rizomanijos radavietė Lietuvos pietvakariuose (Šakių raj.) (Jackeviciene ir kt., 2005). 2005 m. antroji rizomanijos infekcijos radavietė buvo aptikta centrinėje Lietuvos dalyje (Kauno raj.) (Žižytė ir kt., 2006; Zizyte ir Staniulis, 2007a). Trečioji BNYVV infekcijos radavietė buvo aptikta 2007 m. Panevėžio rajone (Valstybinė augalų apsaugos tarnyba).

2009 m. cukrinių runkelių šaknų mėginiai su įtariamais rizomanijos ligos simptomais buvo renkami ir Ukrainos cukrinių runkelių auginimo zonoje Rivnenska, Lvivska, Ternopilska, Ivano-Frankivska, Černivecka, Chmelnycka, Vinnycka ir Žytomyrska srityse. 7 mėginiai iš Kazachstano buvo perduoti mums Kazachstano Žemdirbystės Instituto mokslininkų. Šiame darbe DAS-IFA metodu buvo ištirti 102 BNYVV cukrinių runkelių mėginiai rasti Lietuvoje, 57 mėginiai rasti Ukrainoje ir 7 mėginiai rasti Kazachstane.

DAS-IFA metodu BNYVV buvo identifikuotas trijuose Lietuvos, dešimtyje Ukrainos ir vienoje Kazachstano vietovėse. Atrinkti izoliatai buvo naudojami molekuliniais viruso tyrimams. BNYVV identifikacija buvo patvirtinta EM ir skirtingais PCR metodais.

Atrinkti BNYVV izoliatai buvo mechaniškai pernešti į indikatorinius augalus, reikalingus viruso sukaujimui, grynimui, saugojimui bei tolesnei analizei. Izoliatų padauginimui bei saugojimui buvo pasirinkti indikatoriniai augalai – *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *T. expansa*. Virusų izoliatų pernešimas į žolinius indikatorinius augalus taip pat buvo patvirtintas DAS-IFA, EM ir skirtingais PCR metodais.

EM ir IEM pagalba tiriamuosiuose augaliniuose mėginiuose buvo aptinkamos įvairaus ilgio, apie 20 nm diametro lazdelės formos BNYVV dalelės, kas atitinka literatūroje pateikiamus duomenis (Richards ir Tamada, 1992; Fauquet ir kt., 2005). EM taip pat buvo naudojama BNYVV grynimui, koncentravimui etapuose ir išgryninto viruso preparatų tyrimui. Išgrynintuose viruso preparatuose aptiktų virionų morfologinės savybės buvo būdingos BNYVV.

Įvairūs PCR metodai buvo taikomi BNYVV identifikacijai. BNYVV nustatymui dažniausiai buvo naudojama vieno žingsnio įprastinė AT-PCR, amplifikuojanti specifinį 500 bp produktą. BNYVV aptikimo jautrumo padidinimui buvo atliekama nPCR, kurios metu susidarė 326 bp produktai. nPCR padidina įprastinės AT-PCR jautrumą ir specifiškumą, svarbų ankstyvos infekcijos nustatymui (Morris ir kt., 2001). Atliekant serologiškai imobilizuoto viruso AT-PCR, iš pradžių virusinis patogenas buvo pagaunamas dėl specifinių antikūnų prieš tą virusą. Po to buvo atliekamos įprastinės AT-PCR arba nPCR, amplifikuojančios atitinkamai 500 bp arba 326 bp produktus.

Yra žinoma, kad BNYVV yra trijų pagrindinių (A, B ir P) tipų, kurie negali būti atskiriami serologiškai. Tačiau naudojant RFLP analizę, daugybinę AT-PCR bei analizuojant viruso CP sekas, buvo nustatyti BNYVV izoliatų tipai.

RNR 2 koduojamo CP ir RNR 3 koduojamo p25 genas buvo padauginti AT-PCR būdu ir naudojami sekoskaitai, reikalingai tiriamų BNYVV izoliatų genų sekų analizei ir palyginimui su kitomis iš genų bankų duomenų bazės gautomis virusų sekomis.

BNYVV CP buvo pasirinktas analizei, nes 62, 103 ir 172 padėtyje turi svarbias aminorūgščių liekanas pagal kurias galima atskirti A tipo (T_{62} , S_{103} , L_{172}) izoliatų nuo B tipo (S_{62} , N_{103} , F_{172}) izoliatų (Kruse ir kt., 1994; Koenig ir kt., 1995; Miyanishi ir kt., 1999). Taip pat pagal CP specifines aminorūgštis (R_{17} ir I_{102}) galima atskirti A tipo izoliatų nuo P tipo. (Koenig ir kt., 1995; Miyanishi ir kt., 1999). RFLP analizės bei daugybinės AT-PCR metodais buvo nustatyti pagrindiniai (A ir B) BNYVV izoliatų tipai. Atlikta CP baltymo sekų filogenetinė analizė patvirtino RFLP ir daugybinės AT-PCR metodais nustatytus BNYVV izoliatų tipus ir patikslino Kazachstano izoliato tipą (P). Taigi, Lietuvoje išskirti BNYVV izoliatai yra A ir B; Ukrainoje – A, o Kazachstane – P tipų.

BNYVV P25 baltymas yra atsakingas už viruso plitimą cukrinių runkelių šaknyse ir tipiškų rizomanijos simptomų susidarymą (Tamada ir kt., 1989; Koenig ir kt., 1991; Tamada ir kt., 1999). Didelis RNR 3 sekos

kintamumas yra aptinkamas P25 baltymą koduojančioje srityje, ypač keturių aminorūgščių tetradoje (67–70 padėtyje). Tai būdinga ypač A tipo izoliatams (Schirmer ir kt., 2005; Yilmaz ir kt., 2007; Chiba ir kt., 2008; Koenig ir kt., 2008; Li ir kt., 2008). P25 baltymo sekos analizė parodė, kad tiriamieji BNYVV izoliatai turi skirtingas aminorūgščių tetradas (67–70 padėtyje). Pagal P25 baltymo sekos filogenetinę analizę Pn izoliatas su AHHG ir ukr2 izoliatas su AYHG tetrada priklauso A tipo CP izoliatams, turintiems kintamus P25 tetrados motyvus ir dažniausiai neturintiems RNR 5 komponento; St ir T izoliatai su AYHR tetrada – B tipo CP izoliatams, turintiems pastovų tetrados motyvą AYHR ir neturintiems RNR 5. Tai atitinka Schirmer ir kt. (2005) nustatytą BNYVV izoliatų koreliaciją tarp CP, P25 ir RNR 5.

Išgrynintas BNYVV buvo panaudotas ne tik viruso morfologijos tyrimui EM, bet ir polikloninių antikūnų gavimui. Imunizavus triušį išgrynintu BNYVV preparatu buvo gauti p-ak. Iš polikloninių antikūnų ir šių polikloninių antikūnų-krienių peroksidazės konjugato buvo suformuota imunofermentinė sistema, leidžianti išskirti BNYVV 0,3–0,15 µg/ml ribose. Tokia gauta sistema gali būti sėkmingai taikoma BNYVV diagnostikai.

IŠVADOS

1. Lietuvoje, Ukrainoje ir Kazachstane aptiktuose cukrinių runkelių mėginiuose, rodančiuose rizomanijos simptomus, imunofermentinės analizės ir molekuliniais metodais identifikuotas runkelių nekrotinio gyslų pageltimo virusas (BNYVV).
2. Rizomanija infekuotuose augalų mėginiuose ir išgrynintuose viruso preparatuose aptiktų virionų morfologinės savybės yra būdingos BNYVV.
3. Filogenetinė BNYVV izoliatų apvalkalo baltymo sekų analizė parodė, kad Lietuvoje išskirti ir išanalizuoti BNYVV izoliatai yra dviejų skirtingų tipų: Pn – A tipo, o St ir T – B tipo. Nustatyta, kad visi Ukrainoje gauti BNYVV izoliatai priklauso A tipui, o izoliatas iš Kazachstano – P tipui.
4. Lietuvoje išskirtų BNYVV izoliatų P25 baltymo sekos turi skirtingas aminorūgščių tetradas (67–70 padėtyje). Filogenetinė BNYVV izoliatų P25 baltymo sekų analizė parodė koreliaciją tarp viruso izoliatų apvalkalo ir P25 baltymų: Lietuvoje išskirti St ir T izoliatai priklauso B tipo viruso izoliatams, turintiems pastovią AYHR tetradą, Pn – A tipo viruso izoliatams, turintiems kintamą tetradą.
5. Gautas išgrynintas BNYVV preparatas yra tinkamas polikloninių antikūnų gavimui.
6. Sukurta imunofermentinė sistema, sudaryta iš gautų polikloninių antikūnų prieš BNYVV bei šių polikloninių antikūnų ir krienų peroksidazės konjugato, tinka BNYVV diagnostikai IFA ir imunobloto metodais.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Abe, H., Tamada, T. 1986. Association of *Beet necrotic yellow vein virus* with isolates of *Polymyxa betae* Keskin. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 52: 235–247.
- Acosta-Leal, R., Fawley, M.W., Rush, C.M. 2008. Changes in the intrasolate genetic structure of *Beet necrotic yellow vein virus* populations associated with plant resistance breakdown. *Virology* 376: 60–68.
- Adams, M. 1990. Epidemiology of fungally-transmitted viruses. *Soil Use Manag* 6: 184–89.
- Adams, M. 1991. Transmission of plant viruses by fungi. *Ann Appl Biol* 118: 479–92.
- Adams, M. J., Antoniw, J. F., Kreuze, J. 2009. *Virgaviridae*: a new family of rod-shaped plant viruses. *Arch Virol* 154:1967–1972.
- Adams, M. J., Antoniw, J. F., Mullins, J. G. L. 2001. Plant virus transmission by plasmodiophorid fungi is associated with distinctive transmembrane regions of virus encoded proteins. *Arch Virol* 146: 1139–53.
- Al Musa, A. M. and Mink, G. I. 1981. *Beet necrotic yellow vein virus* in North-America. *Phytopathology* 71: 773–776.
- Andika, I. B., Kondo, H., Tamada, T. 2005. Evidence that RNA silencing mediated resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* is less effective in roots than in leaves. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 194–204.
- Asher, M. J. C. 1993. Rhizomania. In: *The Sugar Beet Crop* (Cook D.A. and Scott, R.K., eds.) London: Chapman and Hall. 311–346.
- Asher, M. J. C. and Barr, K. J. 1990. The host range of *Polymyxa betae* and resistance in *Beta* species. In: *Proceedings of the First Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*. 65–68.
- Asher, M. J. C., Chwarszczynska, D. M., Leaman, M. 2002. The evaluation of rhizomania resistant sugar beet for the UK. *Ann Appl Biol* 141: 101–109.
- Asher, M. J. C., Grimmer, M. K., Mutasa-Göttgens, E. S. 2009. The selection and characterisation of resistance to *Polymyxa betae*, vector of *Beet necrotic yellow vein virus*, derived from wild sea beet. *Plant Pathol* 58: 250–260.
- Barker, H. 1987. Invasion of non-phloem tissue in *Nicotiana clevelandii* by *potato leafroll luteovirus* is enhanced in plants also infected with *potato Y potyvirus*. *J Gen Virol* 68: 1223–1227.
- Barr, D. 1979. Morphology and host range of *Polymyxa graminis*, *Polymyxa betae*, and *Ligniera pilorum* from Ontario and some other areas. *Can J Plant Pathol* 1: 85–94.

- Barr, D. 1982. Zoospore structure of *Polymyxa graminis* (Plasmodiophoromycetes). *Can J Plant Pathol* 60: 2496–2504.
- Barr, D. and Asher, M. 1992. The host range of *Polymyxa betae* in Britain. *Plant Pathol* 41: 64–88.
- Barr, K. J., Asher, M. J. C., Lewis, B. G. 1995. Resistance to *Polymyxa betae* in wild Beta species. *Plant Pathol* 44: 301–307.
- Biancardi, E., Lewellen, R. T., DeBiaggi, M., Erichsen, A. W., Stevanato, P. 2002. The origin of rhizomania resistance in sugar beet. *Euphytica* 127: 383–397.
- Blunt, S., Asher, J., Gilligan C. 1991. Infection of sugar beet by *Polymyxa betae* in relation to soil temperature. *Plant Pathol* 40: 257–267.
- Bolz, G. and Koch, G. 1983. Aussichten der Resistenz-(Toleranz) Züchtung im Rahmen der Bekämpfung der Rizomania. *Gesunde Pflanzen* 35: 275–278.
- Bouzoubaa, S. E. 1998. *Furovirus* isolation and RNA extraction. In: *Methods in molecular biology. Plant virology protocols: from virus isolation to transgenic resistance.* (Foster, G. D., Taylor, S. C., eds.) Totowa, NJ: Humana press Inc. 81: 107–114.
- Bouzoubaa, S., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K., Putz, C. 1985. Nucleotide sequence analysis of RNR-3 and RNR-4 of *beet necrotic yellow vein virus* isolates F2 and G1. *J. Gen Virol* 66: 1553–1564.
- Bouzoubaa, S., Quillet, L., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. 1987. Nucleotide sequence of *beet necrotic yellow vein virus* RNA-1. *J Gen Virol* 68: 615–626.
- Bouzoubaa, S., Ziegler, V., Beck, D., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G. 1986. Nucleotide sequence of *beet necrotic yellow vein virus* RNA-2. *J Gen Virol* 67: 1689–1700.
- Braselton, J. P. 1995. Current status of the plasmodiophorids. *Crit Rev Microbiol* 21: 263–275.
- Bulman, S. R., Kuhn, S. F., Marshall, J. W., Schnepf, E. 2001. A phylogenetic analysis of the SSU rRNA from members of the *Plasmodiophora* and *Phagomyxida*. *Protist* 152: 43–51.
- Bürcky, K. 1987. BNYVV Resistenz indizierende Merkmale und deren mögliche Nützung zur Selektion rizomaniatoleranter Zuckerrüben. *Proc 50th IIRB cong, Brussels* 131–137.
- Bürcky, K. and Büttner, G. 1991. Gehalt an *beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in der Hauptwurzel von Zuckerrübenpflanzen verschiedener Sorten und deren Leistung unter Rizomaniabefall im Feld. *J Phytopathol* 131: 1–10.
- Buttner, G., Marlander, B., Manthey, R. 1995. Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Breed* 114: 160–164.

- Campbell, R. 1996. Fungal transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 34: 87–108.
- Canova, A. 1959. Appunti di patologia della barbabietola. *Inf Fitopatol* 20: 390–396.
- Canova, A. 1966. Si studia la rizomanie della bietola. *Inf Fitopatol* 16: 235–239.
- Cavalier-Smith, T. and Chao, E. E. Y. 2003. Phylogeny and classification of phylum *Cercozoa* (Protozoa), *Protist* 154: 341–358.
- Chen, J. P., Swaby, A. G., Adams, M. J., Yili, R. 1991. *Barley mild mosaic virus* inside its fungal vector, *Polymyxa graminis*. *Ann Appl Biol* 118: 615–621.
- Chiba, S., Miyanishi, M., Andika, I. B., Kondo, H., Tamada, T. 2008. Identification of amino acids of the *Beet necrotic yellow vein virus* p25 protein required for induction of the resistance response in leaves of *Beta vulgaris* plants. *J Gen Virol* 89: 1314–1323.
- Chiba, S., Miyanishi, M., Kondo, H., Tamada, T. 2003. Single amino acid changes in the 25 protein of *Beet necrotic yellow vein virus* determine resistance responses of *Beta vulgaris* spp. *maritima*. In: Proceedings of the Fifth Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors. 5–8.
- Ciafardini, G. 1991. Evaluation of *Polymyxa betae* Keskin contaminated by *Beet necrotic yellow vein virus* in soil. *Appl Environ Microbiol* 57: 1817–1821.
- Clark, M. F. and Adams, N. A. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme – linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J Gen Virol* 34: 475–483.
- De Biaggi, M. 1987. Methodes de selection – un cas concret. *Proc. IIRB 50th Winter Cong. Brussels, Belgium*. 2: 157–163.
- Derrick, K. S. 1973. Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Virology* 56: 652–653.
- Dessens, J. and Meyer, M. 1996. Identification of structural similarities between putative transmission proteins of *Polymyxa* and *Spongospora* transmitted by *bymoviruses* and *furoviruses*. *Virus Genes* 12: 95–99.
- Diao, A., Chen, J., Gitton, F., Antoniwi, J., Mullins, J., Hall, A. M., Adams, M. J. 1999. Sequences of *European wheat mosaic virus* and *Oat golden stripe virus* and genome analysis of the genus *Furovirus*. *Virology* 261(2): 331–339.
- Dubois, F., Sangwan, R. S., Sangwan-Norreel, B. S. 1994. Immunogold labelling and electron microscopic screening of *Beet necrotic yellow vein virus* in the fungus *Polymyxa betae* infecting *Beta vulgaris* root cortical parenchyma cell. *Int J Plant Sci* 155: 545–552.

- Duffus, J. E., Liu, H. Y., 1987. First report of rhizomania of sugar beet from Texas. *Plant Dis* 71: 557.
- Duffus, J. E., Whitney, E. D., Larsen, R. C., Liu, H. Y., Lewellen, R. T., 1984. First report in western hemisphere of rhizomania of sugar beet caused by *beet necrotic yellow vein virus*. *Plant Dis* 68: 251.
- Dunoyer, P., Pfeffer, S., Fritsch, C., Hemmer, O., Voinnet, O., Richards, K.E. 2002. Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by *Peanut clump virus*. *Plant J* 29: 555–567.
- Erhardt, A., Vetter, G., Gilmer, D., Bouzoubaa, S., Richards, K., Jonard, G., Guilley, H. 2005. Subcellular localization of the Triple Gene Block movement proteins of *Beet necrotic yellow vein virus* by electron microscopy. *Virology* 340: 155–166.
- Erhardt, M., Dunoyer, P., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G., Bouzoubaa, S. 2001. *Beet necrotic yellow vein virus* particles localize to mitochondria during infection. *Virology* 286: 256–262.
- Erhardt, M., Morant, M., Ritzenthaler, C., Stussi-Garaud, C., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G., Bouzoubaa, S., Gilmer, D. 2000. P42 movement protein of *Beet necrotic yellow vein virus* is targeted by the movement proteins P13 and P15 to punctate bodies associated with plasmodesmata. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 520–528.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (OEPP/EPPO). 2005. First record of *Beet necrotic yellow benyvirus* in Morocco. EPPO Reporting Service 2005, 7: 2005/102.
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. 2005. Virus Taxonomy. Eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virology Division International Union of Microbiological Societies*. 1043–1048.
- Fauquet, C., Desbois, D., Fargette, D., Vidal, G. 1988. Classification of *Furoviruses* based upon the amino acid composition of their coat proteins. *Devel Appl Biol* 2: 19–36.
- Fecker, L. F., Koenig, R., Obermeier, C. 1997. *Nicotiana benthamiana* plants expressing *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) coat protein specific scFv are partially protected against the establishment of the virus in the early stages of infection and its pathogenic effects in the late stages of infection. *Arch Virol* 142: 1857–1863.
- Franc, G. D., Kerr, E. D., Brown, W. Jr., Riesselman J. H. 1997. Rhizomania of sugar beets. B-979R. University of Wyoming. 1–6.
- Fujisawa, I. and Sugimoto, T. 1977. Transmission of *Beet necrotic yellow vein virus* by *Polomyxa betae*. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 43: 583–586.

- Fujisawa, I., Sugimoto, T., Sugawara, H., Hichiji, M. 1982. Comparing resistance to Rhizomania disease among sugar beet varieties and strains. *Proc Sugar Beet Res Assoc Japan* 24: 163–169.
- Gao, J. L., Deng, F., Zhai, H. Q., Ling, X. S., Liu, Y. 1983. The occurrence of sugar beet rhizomania caused by *Beet necrotic yellow vein virus* in China. *Acta Phytopathol Sin* 13: 1–4.
- Gerik, J. and Duffus, J. 1988. Differences in vectoring ability and aggressiveness of isolates of *Polymyxa betae*. *Phytopathology* 78: 1340–1343.
- Gidner, S., Lennefors, B. L., Nilsson, N. O., Bensefelt, J., Johansson, E., Gyllenspetz, U., Kraft, T. 2005. QTL mapping of BNYVV resistance from the WB41 source in sugar beet. *Genome* 48: 279–285.
- Gilmer, D., Bouzoubaa, S., Hehn, A., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G. 1992. Efficient cell-to-cell movement of *Beet necrotic yellow vein virus* requires 3' proximal genes located on RNA-2. *Virology* 189: 40–47.
- Giunchedi, L., De Biaggi, M., Polini, C. 1985. Evaluation of ELISA technique for the screening of Rhizomania-tolerant sugar beet genotypes. *Proc. IIRB 48th Winter Cong., Brussels*: 385–390.
- Giunchedi, L., De Biaggi, M., Polini, C. 1987. Correlation between tolerance and *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beet genotypes. *Phytopathol Mediterr* 26: 23–28.
- Harju, V. A., Mumford, R. A., Blockley, A., Boonham, N., Clover, G. R. G., Weekes, R., Henry, C. M. 2002. Occurrence in the United Kingdom of *Beet necrotic yellow vein virus* isolates which contain RNA 5. *Plant Pathol* 51: 811.
- Harveson, R. and Rush, C. 1994. Evaluation of fumigation and rhizomania-tolerant cultivars for control of a root disease complex of sugar beets. *Plant Dis* 78: 1197–1202.
- Harveson, R. and Rush, C. 2002. The influence of irrigation frequency and cultivar blends on the severity of multiple root diseases in sugar beets. *Plant Dis* 86: 901–908.
- Harveson, R., Rush, C. M., Wheeler, T. 1996. The spread of *Beet necrotic yellow vein virus* from point source inoculations as influenced by irrigation and tillage. *Phytopathology* 86: 1242–1247.
- Hecht, H. 1989. Rhizomania – ‘Bekämpfung’ durch den züchterischen Fortschritt im Rahmen des Spektrums toleranter Zuckerrüben-Sorten: Wirksamkeit bei fehlendem, schwachem und starkem *Beet-necrotic-yellow-vein-Virus*-Befall. *Bayerisches Landwirtschaftliches Jahrbuch* 66: 515–527.
- Hehn, A., Bouzoubaa, S., Bate, N., Twell, D., Marbach, J., Richards, K., Guilley, H., Jonard, G. 1995. The small cysteine-rich protein p14 of *Beet*

necrotic yellow vein virus regulates accumulation of RNA-2 in cis and coat protein in trans. *Virology* 210: 73–81.

- Hehn, A., Fritsch, C., Richards, K. E., Guilley, H., Jonard, G. 1997. Evidence for in vitro and in vivo autocatalytic processing of the primary translation product of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA 1 by a papainlike proteinase. *Arch Virol* 142: 1051–1058.
- Heidel, G. B. and Rush, C. M. 1994. Distribution of *Beet necrotic yellow vein virus*, *Beet distortion mosaic virus*, and an unnamed soilborne sugarbeet virus in Texas and New Mexico. *Plant Dis* 78: 603–606.
- Heidel, G. B., Rush, C. M., Kendall, T. L., Lommel, S. A., French, R. C. 1997. Characteristics of *beet soilborne mosaic virus*, a Furo-like virus infecting sugar beet. *Plant Dis* 81:1070–1076.
- Heijbroek, W. 1989. The development of Rhizomania in two areas of the Netherlands and its effect on sugar-beet growth and quality. *Eur J Plant Pathol* 95: 27–35.
- Heijbroek, W., Musters, P. M. S., Schoone, A. H. L. 1999. Variation in pathogenicity and multiplication of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in relation to the resistance of sugar-beet cultivars. *Eur J Plant Pathol* 105: 397–405.
- Henry, C. 1996. Rhizomania—its effect on sugar-beet yield in the UK. *Br Sug Beet Rev* 64: 24–26.
- Henry, C. M., Barker, I., Morris, J., Hugo, S.A., 1995. Detection of *beet necrotic yellow vein virus* using reverse transcription and polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 54: 15–28.
- Hugo, S., Henry, C., Harju, V. 1996. The role of alternative hosts of *Polymyxa betae* in transmission of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in England. *Plant Pathol* 45: 662–666.
- Yao, H., Liu, Y., Yu, J., Cai, Z., Ao, G., Yang, L. 1993. The cloning and sequencing of coat protein gene from *beet necrotic yellow vein virus*. *Chin J Biotechnol* 9(2): 131–135.
- Yilmaz, N. D. K., Meunier, A., Schmit, J. F., Stas, A., Bragard, C. 2007. Partial nucleotide sequence analysis of Turkish isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) RNA-3. *Plant Pathol* 56: 311–316.
- Jackeviciene, E. Staniulis, J., Zitikaite, I., Taluntyte, L., Jankuviene, L., Vascilo, I. 2005. Detection of *Beet necrotic yellow vein virus* in Lithuania. In *Proceeding of the 6th symposium of the IWGPVFFV*. Bologna:Universita di Bologna. 150–153.
- Jakubikova, L., Šubikova, V., Nemčovič, M., Farkaš, V. 2006. Selection of natural isolates of *Trichoderma* spp. for biocontrol of *Polymyxa betae* as a vector of virus causing rhizomania in sugar beet. *Biologia* 61: 347–351.

- Jupin, I., Guilley, H., Richards, K. E., Jonard, G. 1992. Two proteins encoded by *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-3 influence symptom phenotype on leaves. *EMBO J* 11: 479–488.
- Jupin, I., Tamada, T., Richards, K. 1991. Pathogenesis of *Beet necrotic yellow vein virus*. *Semin Virol* 2: 121–129.
- Kanyuka, K., Ward, E., Adams, M. J. 2003. *Polymyxa graminis* and the cereal viruses it transmits: a research challenge. *Mol Plant Pathol* 4: 393–406.
- Kanzawa, K. and Ui, T. 1972. A note on rhizomania of sugar beet in Japan. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 38: 434–435.
- Kashiwazaki, S., Scott, K., Reavy, B., Harrison, B. 1995. Sequence analysis and gene content of *Potato mop top virus* RNA 3: Further evidence of heterogeneity in the genome organization of *Furoviruses*. *Virology* 206: 701–706.
- Kastirr, U., Pfeilstetter, E., Burgermeister, W. 1994. Virus content and virulence of *Polymyxa betae* Keskin isolates obtained from different regions in Europe. *J Phytopathol* 141: 369–374.
- Kaufmann, A., Koenig, R., Lesemann, D. E. 1992. Tissue printimmunoblotting reveals an uneven distribution of *Beet necrotic yellow vein virus* and *Beet soil-borne viruses* in sugarbeets. *Arch Virol* 126: 329–335.
- Keskin, B. 1964. *Polymyxa betae* n.sp., ein Parasit in den Wurzeln von *Beta vulgaris* Tournefort, besonders während der Jugendentwicklung der Zuckerrübe. *Arch Für Mikrobiol* 49: 218–226.
- Keskin, B. and Fuchs, W. H. 1969. Der Infektionsvorgang bei *Polymyxa betae*. *Arch Microbiol* 68: 218–226.
- Kiguchi, T., Saito, M., Tamada, T. 1996. Nucleotide sequence analysis of RNA-5 of five isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* and the identity of a deletion mutant. *J Gen Virol* 77: 575–580.
- Klein, E., Link, D., Schirmer, A., Erhardt, M., Gilmer, D. 2007. Sequence variation within *Beet necrotic yellow vein virus* p25 protein influences its oligomerization and isolate pathogenicity on *Tetragonia expansa*. *Virus Res* 126: 53–61.
- Koenig, R. 2000. Deletions in the KTER-encoding domain, which is needed for *Polymyxa* transmission, in manually transmitted isolates of *Beet necrotic yellow vein benyvirus*. *Arch Virol* 145: 165–170.
- Koenig, R. and Lennefors, B. L. 2000. Molecular analyses of European A, B and P type sources of *Beet necrotic yellow vein virus* and detection of the rare P type in Kazakhstan. *Arch Virol* 145: 1561–1570.
- Koenig, R. and Valizadeh, J. 2008. Molecular and serological characterization of an Iranian isolate of *Beet black scorch virus*. *Arch Virol* 153: 1397–1400.

- Koenig, R., Beier, C., Commandeur, U., Luth, U., Kaufmann, A., Luddecke, P. 1996. *Beet soilborne virus* RNA 3 - A further example of the heterogeneity of the gene content of *Furovirus* genomes and of triple gene blockcarrying RNAs. *Virology* 216: 202–207.
- Koenig, R., Haeberle, A. M., Commandeur, U. 1997. Detection and characterization of a distinct type of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA 5 in a sugarbeet growing area in Europe. *Arch Virol* 142: 1499–1504.
- Koenig, R., Jarasch, W., Li, Y., Commandeur, U., Burgermeister, W., Gehrke, M., Luddecke, P. 1991. Effect of recombinant *Beet necrotic yellow vein virus* with different RNA compositions on mechanically inoculated sugar-beets. *J Gen Virol* 72: 2243–2246.
- Koenig, R., Kastirr, U., Holtschulte, B., Deml, G., Varrelmann, M. 2008. Distribution of various types and P25 subtypes of *Beet necrotic yellow vein virus* in Germany and other European countries. *Arch. Virol.* 153(11):2139-2144.
- Koenig, R., Luddecke, P., Haeberle, A. M. 1995. Detection of *Beet necrotic yellow vein virus*-strains, variants and mixed infections by examining single-strand conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *J Gen Virol* 76: 2051–2055.
- Kruse, M., Koenig, R., Hoffmann, A., Kaufmann, A., Commandeur, U., Solovyev, A. G., Savenkov, I., Burgermeister, W. 1994. Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription PCR products reveals the existence of two major strain groups of *Beet necrotic yellow vein virus*. *J Gen Virol* 75: 1835–1842.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Larson, R. L., Wintermantel, W. M., Hill, A., Fortis, L., Nunez, A. 2008. Proteome changes in sugar beet in response to *Beet necrotic yellow vein virus*. *Physiol Mol Plant Pathol* 72: 67–72.
- LeGreve, A., Delfosse, P., Maraite, H. 2002. Phylogenetic analysis of *Polymyxa* species based on nuclear 5.8S and internal transcribed spacers ribosomal DNA sequences. *Mycol Res* 106: 138–147.
- LeGreve, A., Delfosse, P., Vanpee, B., Goffin, A., Maraite, H. 1998. Differences in temperature requirements between *Polymyxa* sp. of Indian origin and *Polymyxa graminis* and *Polymyxa betae* from temperate areas. *Europ J Plant Pathol* 104: 195–205.
- LeGreve, A., Vanpee, B., Delfosse, P., Maraite, H. 1999. High temperature during storage favours infection potential of resting spores of *Polymyxa graminis* of Indian origin. *Ann Appl Biol* 134: 163–169.
- LeGreve, A., Vanpee, B., Delfosse, P., Maraite, H. 2000. Host range of tropical and subtropical isolates of *Polymyxa graminis*. *Eur J Plant Pathol* 106: 379–389.

- Lennefors, B. L., Lindsten, K., Koenig, R. 2000. First record of A and B type *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beets in Sweden. *Eur J Plant Pathol* 106: 199–201.
- Lennefors, B. L., Savenkov, E. I., Bensefelt, J., Wremerth-Weich, E., Van Roggen, P., Tuveesson, S., Valkonen, J. P. T., Gielen, J. 2006. dsRNA-mediated resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* infections in sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*). *Mol Breeding* 18: 313–325.
- Lennefors, B. L., Savenkov, E., Mukasa, S., Valkonen, J. 2005. Sequence divergence of four soilborne sugarbeet-infecting viruses. *Virus Genes* 31(1):57–64.
- Lennefors, B. L., Van Roggen, P., Yndgaard, F., Savenkov, E. I., Valkonen, J. P. T. 2008. Efficient dsRNA-mediated transgenic resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beets is not affected by other soilborne and aphid-transmitted viruses. *Transgenic Res* 17: 219–228.
- Lewellen, R. T. 1997. Registration of sugarbeet germplasm lines C78, C80, and C82. *Crop Sci* 37: 1037.
- Lewellen, R. T., Skoyen, I. O., Erichsen, A. W. 1987. Breeding sugar beet for resistance to Rhizomania: Evaluation of host–plant reactions and selection for and inheritance of resistance. *Proc. IIRB 50th Winter Cong., Brussels, Belgium*. 2: 139–156.
- Li, D., Yu, J., Han, C., Xing, Y., Liu, Y., Chen, S. 1998. Sequence analysis of RNA3 from *beet necrotic yellow vein virus* NM isolate and expression of 25 kDa protein gene in *E.coli*. *Ping Tu Hsueh Pao* 14: 165–171.
- Li, M., Liu, T., Wang, B., Han, C., Li, D., Yu, J. 2008. Phylogenetic analysis of *Beet necrotic yellow vein virus* isolates from China. *Virus Genes* 36(2): 429–432.
- Link, D., Schmidlin, L., Schirmer, A., Klein, E., Erhardt, M., Geldreich, A., Lemaire, O., Gilmer, D. 2005. Functional characterization of the *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-5-encoded p26 protein: evidence for structural pathogenicity determinants. *J Gen Virol* 86: 2115–2125.
- Liu, H. and Lewellen, R. T. 2008. Suppression of resistance-breaking *Beet necrotic yellow vein virus* isolates by *Beet oak-leaf virus* in sugar beet. *Plant Dis* 92: 1043–1047.
- Liu, H. Y. and Lewellen, R. T. 2007. Distribution and molecular characterization of resistance-breaking isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* in the United States. *Plant Dis* 91: 847–851.
- Liu, H. Y., Sears, J. L., Lewellen, R. T. 2005. Occurrence of resistance-breaking *Beet necrotic yellow vein virus* of sugar beet. *Plant Dis*. 89, 464–468.

- Lu, X., Yamamoto, S., Tanaka, M., Hibi, T., Namba, S. 1998. The genome organization of the *Broad bean necrosis virus* (BBNV). Arch. Virol. 143: 1335–1348.
- Mahmood, T. and Rush, C. M. 1999. Evidence of cross-protection between *Beet soilborne mosaic virus* and *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beet. Plant Dis 83: 521–526.
- Maier, I., Parodi, E., Westermeier, R., Muller, D. G. 2000. *Maullinia ectocarpii* gen. et sp nov (*Plasmodiophorea*), an intracellular parasite in *Ectocarpus siliculosus* (*Ectocarpales*, *Phaeophyceae*) and other filamentous brown algae. Protist 151: 225–238.
- Mayo, M. A. 1999. Developments in plant virus taxonomy since the publication of the 6th ICTV Report. Arch Virol 144: 1659–1666.
- Mannerlöf, M., Lennerfors, B. L., Tenning, P. 1996. Reduced titer of BNYVV in transgenic sugar beets expressing the BNYVV coat protein. Euphytica 90: 293–299.
- Martin, F. N. and Whitney, E. D. 1990. In-bed fumigation for control of rhizomania of sugar-beet. Plant Dis 74: 31–35.
- Matthews, R. E. F. 1991. Plant Virology. Third edition. Academic Press. New York, London. 44–45.
- McGrann, G. R. D., Martin, L. D., Kingsnorth, C. S., Asher, M. J. C., Adams, M. J., Mutasa-Göttgens, E. S. 2007. Screening for genetic elements involved in the nonhost response of sugar beet to the plasmodiophorid cereal root parasite *Polymyxa graminis* by representational difference analysis. J Gen Plant Pathol 73: 260–265.
- McGrann, G. R. D., Townsend, B. J., Antoniw, J. F., Asher, M. J. C., Mutasa-Göttgens, E. S. 2009. Barley elicits a similar early basal defence response during host and non-host interactions with *Polymyxa* root parasites. Eur J Plant Pathol 123: 5–15.
- McGrann, G. R. D., Grimmer, M. K., Mutasa-Göttgens, E. S., Stevens, M. 2009. Review. Plant diseases that changed the world. Progress towards the understanding and control of sugar beet rhizomania disease. Mol Plant Pathol 10(1): 129–141.
- Mesbah, M., Scholten, O. E., DeBock, T. S. M., Lange, W. 1997. Chromosome localisation of genes for resistance to *Heterodera schachtii*, *Cercospora beticola* and *Polymyxa betae* using sets of *Beta procumbens* and *B. patellaris* derived monosomic additions in *B. vulgaris*. Euphytica 97: 117–127.
- Meunier, A., Schmit, J. F., Bragard, C. 2005. Comparison of the *Beet necrotic yellow vein virus* P75 nucleotide sequences of Belgian type A and type B sources. Virus Res 108: 15–22.

- Meunier, A., Schmit, J. F., Stas, A., Kutluk, N., Bragard, C. 2003. Multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of *Beet necrotic yellow vein virus*, *Beet soilborne virus*, *Beet virus Q* and their vector *Polymyxa betae* KESKIN on sugar beet. *Appl Environ Microbiol* 69: 2356–2360.
- Miyaniishi, M., Kasume, T., Saito, M., Tamada, T., 1999. Evidence for three groups of sequence variants of *beet necrotic yellow vein virus* RNA 5. *Arch Virol* 144: 879–892.
- Morris, J., Clover, G. R. G., Harju, V. A., Hugo, S. A., Henry, C. M. 2001. Development of a highly sensitive nested RT-PCR method for *Beet necrotic yellow vein virus* detection. *J Virol Methods* 95: 163–169.
- Mouhanna, A. M., Nasrallah, A., Langen, G., Schlosser, E. 2002. Surveys for *Beet necrotic yellow vein virus* (the cause of rhizomania), other viruses, and soil-borne fungi infecting sugar beet in Syria. *J Phytopathol* 150: 657–662.
- Mukhopadhyay, A. N. 1987. *CRC Handbook on Diseases of Sugar Beet*. Vol 1. CRC Press (Boca Raton, FL)
- Nielsen, S. L., Nicolaisen, M., Scheel, C., Dinesen, I. G. 2001. First record of *Beet necrotic yellow vein virus* in Denmark. *Plant Dis* 85: 559.
- OEPP/EPPO 2004. Diagnostic protocols for regulated pests PM 7/30(1). *Beet necrotic yellow vein benyvirus*. *Bulletin* 34: 229–237.
- Paul, H., Henken, B., Alderlieste, M. F. J. 1992a. A greenhouse test for screening sugar beet (*Beta vulgaris*) for resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV). *Neth J Plant Pathol* 98: 65–75.
- Paul, H., Henken, B., Debock, T. S. M., Lange, W. 1992b. Resistance to *Polymyxa betae* in *Beta* species of the Section *Procumbentes*, in hybrids with *Beta vulgaris* and in monosomic chromosome additions of *Beta procumbens* in *Beta vulgaris*. *Plant Breeding* 109: 265–273.
- Paul, H., Henken, B., Scholten, O. E., De Bock, T. S. M., Lange, W. 1993a. Variation in the level of infection with *Polymyxa betae* and its effect on infection with *Beet necrotic yellow vein virus* in beet accession of the sections *Beta* and *Corollinae*. In: *Proceedings of the Second Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*. 133–136.
- Paul, H., Henken, B., Scholten, O. E., Lange, W. 1993b. Use of zoospores of *Polymyxa betae* in screening beet seedlings for resistance to *Beet necrotic yellow vein virus*. *Neth J Plant Pathol* 99: 151–160.
- Pelsy, F. and Merdinoglu, D. 1996. Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA markers linked to a Rhizomania resistance gene in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by bulked segregant analysis. *Plant Breed* 115: 371–377.

- Piccinni, G. and Rush, C. 2000. Determination of optimum irrigation regime and water use efficiency of sugar beet grown in pathogen infested soil. *Plant Dis* 84: 1067–1072.
- Prillwitz, H. and Schlösser, E. 1992. *Beet soil-borne virus*: occurrence, symptoms and effect on plant development. *Med Fac Landbouww Rijksuniv Gent* 57: 295–302.
- Prillwitz, H. and Schlösser, E. 1993. Interactions between *Beet soil-borne virus* (BSBV-2) and *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV). In: Proceedings of the Second Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors. 71–74.
- Putz, C. 1977. Composition and structure of *Beet necrotic yellow vein virus*. *J Gen Virol* 35: 397–401.
- Putz, C., Kuszala, M. 1978. La rhizomanie de la betterave sucrière en Alsace. Recherche d'une nouvelle méthode de purification du "*Beet necrotic yellow vein virus*". *Ann Phytopathol* 10:247–262.
- Rahim, M. D., Andika, I. B., Han, C., Kondo, H., Tamada, T. 2007. RNA4-encoded p31 of *Beet necrotic yellow vein virus* is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. *J Gen Virol* 88: 1611–1619.
- Ratti, C., Clover, G. R. G., Autonell, C. R., Harju, V. A., Henry, C. A. 2005. A multiplex RT-PCR assay capable of distinguishing *Beet necrotic yellow vein virus* types A and B. *J Virol Methods* 124: 41–47.
- Reed, J. C., Kasschau, K. D., Prokhnovsky, A. I., Gopinath, K., Pogue, G. P., Carrington, J. C., Dolja, V. V. 2003. Suppressor of RNA silencing encoded by *Beet yellows virus*. *Virology* 306: 203–209.
- Resca, R., Basaglia, M., Poggiolini, S., Vian, P., Bardin, S., Walsh, U. F., Barreiros, C. M. E., O'Gara, F., Nuti, M. P., Casella, S., Peruch, U. 2001. An integrated approach for the evaluation of biological control of the complex *Polymyxa betae/Beet necrotic yellow vein virus*, by means of seed inoculants. *Plant and Soil* 232: 215–226.
- Richard-Molard, M. 1984. Beet rhizomania disease: the problem in Europe. In: Brighton Crop Protection Conference. 837–845.
- Richard-Molard, M. S. 1985. Rhizomania: a world-wide danger to sugar beet. *Span* 28: 92–94.
- Richards, K. E. and Tamada, T. 1992. Mapping functions on the multipartite genome of *Beet necrotic yellow vein virus*. *Annu Rev Phytopathol* 30: 291–313.
- Rochon, D., Kakani, K., Robbins, M., Reade, R. 2004. Molecular aspects of plant virus transmission by ophiomyia and plasmodiophorid vectors. *Annu Rev Phytopathol* 42: 211–241.

- Rush, C. M. 2003. Ecology and epidemiology of benyviruses and plasmodiophorid vectors. *Annu Rev Phytopathol* 41: 567–592.
- Rush, C. M. and Heidel G. 1995. *Furovirus* diseases of sugar beets in the United States. *Plant Dis* 79: 868–875.
- Rush, C. M., Liu, H. Y., Lewellen, R. T., Acosta-Leal, R. 2006. The continuing saga of Rhizomania of sugar beets in the United States. *Plant Dis* 90(1): 4–15.
- Saito, M., Kiguchi, T., Kusume, T., Tamada, T. 1996. Complete nucleotide sequence of the Japanese isolate S of *beet necrotic yellow vein virus* RNA and comparison with European isolates. *Arch Virol* 141: 2163–2175.
- Schirmer, A., Link, D., Cognat, V., Moury, B., Beuve, M., Meunier, A., Bragard, C., Gilmer, D., Lemaire, O. 2005. Phylogenetic analysis of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* collected worldwide. *J Gen Virol* 86: 2897–2911.
- Schmitt, C., Balmori, E., Jonard, G., Richards, K. E., Guilley, H. 1992. *In vitro* mutagenesis of biologically-active transcripts of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-2—evidence that a domain of the 75-kDa readthrough protein is important for efficient virus assembly. *Proc Natl Acad Sci* 89: 5715–5719.
- Scholten, O. E. and Lange, W. 2000. Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: a review. *Euphytica* 112: 219–231.
- Scholten, O. E., DeBock, T. S. M., Klein-Lankhorst, R. M., Lange, W. 1999. Inheritance of resistance to *beet necrotic yellow vein virus* in *Beta vulgaris* conferred by a second gene for resistance. *Theor Appl Genet* 99:740–746.
- Scholten, O. E., Jansen, R. C., Keizer, L. C. P., DeBock, T. S. M., Lange, W. 1996. Major genes for resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in *Beta vulgaris*. *Euphytica*, 91: 331–339.
- Scholten, O. E., Paul, H., Peters, D., Van Lent, J. W. M., Goldbach, R. W. 1994. In situ localisation of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in rootlets of susceptible and resistant beet plants. *Arch Virol* 91: 331–339.
- Scott, K., Kashiwazaki, S., Reavy, B., Harrison, B. 1994. The nucleotide sequence of *Potato mop top virus* RNA 2: a novel type of genome organization for a *Furovirus*. *J Gen Virol* 75: 3561–3568.
- Shirako, Y., Suzuki, N., French, R. C. 2000. Similarity and divergence among viruses in the genus *Furovirus*. *Virology* 270: 201–207.
- Sohi, H. H. and Maleki, M. 2004. Evidence for presence of types A and B of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in Iran. *Virus Genes* 29: 353–358.

- Stacey, A. J., Truscott, J. E., Asher, M. J. C., Gilligan, C. A. 2004. A model for the invasion and spread of rhizomania in the United Kingdom: implications for disease control strategies. *Phytopathology* 94: 209–215.
- Stevens, M. and Asher, M. J. C. 2005. Preliminary investigations into the interactions between *Beet mild yellowing virus* (BMVYV) and *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in susceptible and rhizomania-resistant varieties. *Asp Appl Biol* 76: 13–17.
- Stevens, M., Freeman, B., Liu, H. Y., Herrbach, E., Lemaire, O. 2005a. Beet poleroviruses: close friends or distant relatives? *Mol Plant Pathol* 6: 1–9.
- Stevens, M., Patron, N. J., Dolby, C. A., Weekes, R., Hallsworth, P. B., Lemaire, O., Smith, H. G. 2005b. Distribution and properties of geographically distinct isolates of sugar beet yellowing viruses. *Plant Pathol* 54: 100–107.
- Strausbaugh, C. A., Rearick, E., Gallian, J. J. 2008. Influence of *Beet necrotic yellow vein virus* on sugar beet storability. *Plant Dis* 92: 581–587.
- Tamada, T. and Abe, H. 1989. Evidence that *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-4 is essential for efficient transmission by the fungus *Polymyxa betae*. *J Gen Virol* 70: 3391–3398.
- Tamada, T. and Baba, T. 1973. *Beet necrotic yellow vein virus* from Rhizomania-affected sugar beet in Japan. *Ann Phytopath Soc Japan* 39: 325–332.
- Tamada, T. and Kusume, T. 1991. Evidence that the 75 K readthrough protein of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-2 is essential for transmission by the fungus *Polymyxa betae*. *J Gen Virol* 72: 1497–1504.
- Tamada, T., Kusume, T., Uchino, H., Kiguchi, T., Saito, M. 1996a. Evidence that *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-5 is involved in symptom development in sugar-beet roots. In: *Proceedings of the Third Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*. 49–52.
- Tamada, T., Miyanishi, M., Kondo, H., Chiba, H., Han, C. G. 2003. Pathogenicity and molecular variability of *Beet necrotic yellow vein virus* isolates from Europe, Japan, China and the United States. In: *Proceedings of the Fifth Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*. 13–16.
- Tamada, T., Schmitt, C., Saito, M., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G. 1996b. High resolution analysis of the readthrough domain of *Beet necrotic yellow vein virus* readthrough protein: a KTER motif is important for efficient transmission of the virus by *Polymyxa betae*. *J Gen Virol* 77: 1359–1367.
- Tamada, T., Shirako, Y., Abe, H., Saito, M., Kiguchi, T., Harada, T. 1989. Production and pathogenicity of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* with different numbers of RNA components. *J Gen Virol* 70: 3399–3409.

- Tamada, T., Uchino, H., Kusume, T., Saito, M. 1999. RNA 3 deletion mutants of *beet necrotic yellow vein virus* do not cause rhizomania disease in sugar beets. *Phytopathology* 89: 1000–1006.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22: 4673–4680.
- Torrance, L., and Mayo, M. A. 1997. Proposed re-classification of *Furoviruses*. *Arch Virol* 142: 435–439.
- Tuitert, G. 1990. Assessment of the inoculum potential of *Polymyxa betae* and *Beet necrotic yellow vein virus* in soil using the most probable number method. *Neth J Plant Pathol* 96: 331–341.
- Tuitert, G. 1993. Horizontal spread of *Beet necrotic yellow vein virus* in soil. *Neth J Plant Pathol* 99: 85–96.
- Tuitert, G. and Hofmeester, Y. 1992. Epidemiology of *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beet at different initial inoculum levels in the presence or absence of irrigation: Dynamics of inoculum. *Neth J Plant Pathol* 98: 343–360.
- Tuitert, G., Musters-Van Oorschot, P. M. S., Heijbroek, W. 1994. Effect of sugar beet cultivars with different levels of resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* on transmission of virus by *Polymyxa betae*. *Eur J Plant Pathol* 100: 201–220.
- United Nations Environment Programme (UNEP) 1987. Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer. UNEP Service No. 87-6106. UNEP.
- Valentin, C., Dunoyer, P., Vetter, G., Schalk, C., Dietrich, A., Bouzoubaa, S. 2005. Molecular basis for mitochondrial localization of viral particles during *Beet necrotic yellow vein virus* infection. *J Virology* 79: 9991–10002.
- Van Geyt, J. P. C., Lange, W., Oleo, M., Debock, T. S. M. 1990. Natural variation within the genus-*Beta* and its possible use for breeding sugarbeet—a review. *Euphytica* 49: 57–76.
- Verchot-Lubicz, J., Rush, C. M., Payton, M., Colberg, T. 2007. *Beet necrotic yellow vein virus* accumulates inside resting spores and zoosporengia of its vector *Polymyxa betae* BNYVV infects *P. betae*. *Virol J* 4: 37–45.
- Vetter, G., Hily, J. M., Klein, E., Schmidlin, L., Haas, M., Merkle, T., Gilmer, D. 2004. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-3-encoded p25 protein. *J Gen Virol* 85: 2459–2469.

- Ward, E. and Adams, M. J. 1998. Analysis of ribosomal DNA sequences of *Polymyxa* species and related fungi and the development of genus- and species-specific primers. *Mycol Res* 102: 965–974.
- Ward, L. I., Fenn, M. G. E., Henry C. M. 2004. A rapid method for direct detection of *Polymyxa* DNA in soil. *Plant Pathology* 53: 485–490.
- Ward, L., Koenig, R., Budge, G., Garrido, C., McGrath, C., Stubbley, H., Boonham, N. 2007. Occurrence of two different types of RNA-5-containing *Beet necrotic yellow vein virus* in the UK. *Arch Virol* 152: 59–73.
- Webb, C., Gilligan, C., Asher, M. 2000. Modeling the effect of temperature on the development of *Polymyxa betae*. *Plant Pathol* 49: 600–607.
- Wisdom, G. B. 2004. Conjugation of antibodies to Horseradish Peroxidase. In: *Methods in Molecular Biology, Immunochemical Protocols*. Third Edition. (Burns R. eds.) Totowa, NJ: Humana press Inc. 295: 127–130.
- Wisler, G. C., Lewellen, R. T., Sears, J. L., Liu, H. Y., Duffus, J. E. 1999. Specificity of TAS-ELISA for *beet necrotic yellow vein virus* and its application for determining rhizomania resistance in field-grown sugar beets. *Plant Dis* 83: 864–870.
- Wisler, G. C., Lewellen, R. T., Sears, J. L., Wasson, J. W., Liu, H. Y., Wintermantel, W. M. 2003. Interactions between *Beet necrotic yellow vein virus* and *Beet soilborne mosaic virus* in sugar beet. *Plant Dis* 87: 1170–1175.
- Zizyte, M. and Staniulis, J. 2007a. Investigations on *Beet necrotic yellow vein virus* in Lithuania. Nordic Association of Agricultural Scientists (NJF) Seminar 402 “Virus vector management in a changing climate”. Kristianstad, Sweden. 33–35.
- Žižytė, M., Kučinskaitė-Kodžė, I., Staniulis, J. 2009. Preparation of polyclonal antiserum to *Beet necrotic yellow vein virus* and its application for immunodiagnosics. *Biologija* 55(3–4): 93–98.
- Žižytė, M., Staniulis, J. 2007b. *Beet necrotic yellow vein virus*: purification and detection by electron microscopy and western blot. “Taras Shevchenko’ Kyiv National University’ Scientific Bulletin, Biology Series”. 51: 54–55.
- Žižytė, M., Staniulis, J., Zitikaitė, I. 2006. Identification of *Beet necrotic yellow vein virus* isolate detected in Lithuania. *Agronomy Research*, 4(Special issue): 475–478.

Publikacijų disertacijos tema sąrašas

1. **Žižytė, M.**, Staniulis, J., Zitikaitė, I. 2006. Identification of *Beet necrotic yellow vein virus* isolate detected in Lithuania. *Agronomy Research*, 4(Special issue): 475–478.
2. **Žižytė, M.**, Staniulis, J. 2007. *Beet necrotic yellow vein virus*: purification and detection by electron microscopy and western blot. “Taras Shevchenko’ Kyiv National University’ Scientific Bulletin, Biology Series”. 51: 54–55.
3. **Zižyte, M.** and Staniulis, J. 2007. Investigations on *Beet necrotic yellow vein virus* in Lithuania. Nordic Association of Agricultural Scientists (NJF) Seminar 402 “Virus vector management in a changing climate”. Kristianstad, Sweden. 33–35.
4. **Žižytė, M.**, Kučinskaitė-Kodžė, I., Staniulis, J. 2009. Preparation of polyclonal antiserum to *Beet necrotic yellow vein virus* and its application for immunodiagnosics. *Biologija* 55(3–4): 93–98.

Pristatymai konferencijose

1. **Žižytė, M.**, Staniulis, J., Zitikaitė, I. Characterization of *Beet necrotic yellow vein virus* isolate detected in Lithuania. International conference „Development of environmentally friendly plant protection“. Pühajärve, Estonia, 2006.
2. **Žižytė, M.** The occurrence and detection of sugar beet disease rhizomania in Lithuania. Second symposium of the agrobiotec network: root soil microbe interaction. Haus Rissen, Hamburg, Germany, 2006.
3. **Žižytė, M.**, Staniulis, J. *Beet necrotic yellow vein virus*: purification and detection by electron microscopy and western blot. V International conference „Bioresources and viruses“, Kyiv, Ukraine, 2007.
4. **Zižyte, M.** and Staniulis, J. Investigations on *Beet necrotic yellow vein virus* in Lithuania. Nordic Association of Agricultural Scientists (NJF). Seminar 402 “Virus vector management in a changing climate”. Kristianstad, Sweden, 2007.
5. **Žižytė, M.**, Staniulis, J. Cukrinių runkelių rizomanijos sukėlėjo aptikimas Lietuvoje ir charakterizavimas. Lietuvos biochemikų draugijos X suvažiavimas-konferencija. „Biochemija ir sistemų biologija“. Tolieja, Lietuva, 2008.
6. **Zižyte, M.** and Staniulis J. Molecular analysis of BNYVV type detected in Lithuania. 7th International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors (IWGPVFFV) symposium. Quedlinburg, Germany, 2008.
7. **Žižytė M.** Cukrinių runkelių rizomaniją sukeliančio viruso identifikacija ir charakterizavimas. Jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“. LMA, Vilnius, Lietuva, 2009.

Padėka

Norėčiau visiems padėkoti už pagalbą ir paramą šio darbo metu. Ypatingai norėčiau padėkoti

- darbo vadovui habil. dr. Juozui Benediktui Staniuliui už galimybę dirbti, vadovavimą, kritines pastabas bei vertingus patarimus;
- moksliniam konsultantui prof. Jari Valkonen už pasidalinimą savo žiniomis ir naudingus patarimus;
- dr. Irenai Zitikaitei, dr. Marijai Samuitienei, habil. dr. Meletėlei Navalinskienei, dr. Laimai Urbanavičienei, Daliai Kulbienei ir visam Fitovirusų laboratorijos kolektyvui už šiltą darbo atmosferą, geranoriškumą ir visokeriopą pagalbą;
- Valstybinės augalų apsaugos tarnybos virusologei Elenai Jackevičienei už palaikymą ir gautus viruso izoliatus;
- Lietuvos agrarinių ir miško mokslo centro filialo Rumokų bandymų stoties darbuotojams už pagalbą tiriant cukrinių runkelių pasėlius Lietuvoje;
- dr. Alisher Nurmukhammedov ir dr. Andriy Syumka (Cukrinių runkelių tyrimo institutas, Ukraina) už draugišką atmosferą ir pagalbą komandiruotės Ukrainoje metu ir gautus viruso izoliatus;
- dr. Aurelijai Žvirblienei ir Indrei Kučinskaitei-Kodzei už pagalbą atliekant eksperimentus su antikūnais;
- dr. Daivai Baltriukienei už pagalbą atliekant imunobloto analizę, naudingus patarimus ir nuoširdų palaikymą;
- savo nuostabiai šeimai, artimiems draugams ir bičiuliams už didelį supratingumą, paramą ir visokeriopą palaikymą.

Finansinė parama

- LVMSF Lietuvos ir Ukrainos dvišalio bendradarbiavimo mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros srityje programos projektas „Runkelių rizomaniją sukeliančio viruso ir kitų dirvožemiu plintančių virusų izoliatų Lietuvoje ir Ukrainoje identifikavimas bei genomo lyginamoji molekulinė charakteristika“, reg. Nr. V-09025, 2009-2010.
- LVMSF stipendija 2006-2009.