

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS TYRIMŲ CENTRO BOTANIKOS INSTITUTAS

ALGIRDAS IVANAUSKAS

FITOPLAZMOS IR JŲ VABZDŽIAI PERNEŠĖJAI LIETUVOJE

Daktaro disertacija

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

Vilnius, 2014

Disertacija rengta 2009–2013 metais Gamtos tyrimų centro Botanikos institute.

Mokslinis vadovas:

dr. Deividas Valiūnas (Gamtos tyrimų centro Botanikos institutas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B, mikrobiologija, bakteriologija, virusologija, mikologija – B 230)

Konsultantas:

habil. dr. Juozas Benediktas Staniulis (Gamtos tyrimų centro Botanikos institutas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B, mikrobiologija, bakteriologija, virusologija, mikologija – B 230)

TURINYS

Santrumpų, terminų sąrašas	5
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1. Fitoplazmų tyrimų apžvalga	11
1.2. Fitoplazmų platintojai	14
1.3. Fitoplazmų ir šeimininkų sąveikos bei simptomai	18
1.4. Fitoplazmų morfologija ir genomai	26
1.5. Fitoplazmų identifikavimas, rrn operonas ir lizdinė PGR	30
1.5.1. Ribosominių baltymų operonas fitoplazmų klasifikacijoje	31
1.5.2. Kitos fitoplazmų klasifikacijoje naudojamos genų sekos	32
1.6. Fitoplazmų taksonominė padėtis	33
1.7. `Candidatus Phytoplasma` gentis ir `Candidatus Phytoplasma` rūšies samprata	34
1.8. Fitoplazmos ir jų tyrimai Lietuvoje	38
1.9. Augalų apsauga	40
2. TYRIMŲ MEDŽIAGOS IR METODAI	43
2.1 Medžiagos	43
2.2 Vabzdžių pavyzdžių rinkimas ir paruošimas	44
2.3. Vabzdžių identifikavimas ir klasifikacija	45
2.4. Tyrimams pasirinkti vabzdžiai	45
2.5. Fitoplazmų pernešimo vabzdžiais bandymai	51
2.6. Simptomatiniai augalai	52
2.7. Augalų ir vabzdžių DNR išskyrimas	53
2.8. Lizdinė PGR	54
2.9. PGR produktų RFIP analizė	54
2.10. DNR elektroforezė	55
2.11. PGR pagausintų genų klonavimas	56
2.12. rDNR nukleotidinės sekos nuskaitymas (sekoskaita)	56
2.13. Nukleotidinių sekų kompiuterinis apdorojimas ir analizė	57
3. DARBO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	59
3.1. Identifikuotos vabzdžių ir augalų rūšys	59
3.2. Dar neištirtos galimų pernešėjų rūšys	63
3.3. 16SrI grupės fitoplazmos	64
3.3.1. 16SrI-A pogrupio fitoplazmos	65
3.3.2. 16SrI-B pogrupio fitoplazmos	68
3.3.3. 16SrI-C pogrupio fitoplazmos	72
3.4. 16SrI grupės fitoplazmų filogenetiniai medžiai	76
3.5. 16SrIII pogrupio fitoplazmos	81
3.5.1. 16SrIII-B pogrupio fitoplazmos	81
3.5.2. 16SrIII-P pogrupio fitoplazmos	83
3.5.3. 16SrIII-T pogrupio fitoplazmos	85
3.6. 16SrIII grupės fitoplazmų filogenetinis medis	87
3.7. 16SrXXI-A pogrupio fitoplazmos	90
3.8. 16SrXXI grupės filogenetinis medis	92

3.9. Apibendrinimas.....	93
4. IŠVADOS.....	97
5. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	99
6. PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	124
PADĖKA	127
PRIEDAI.....	129

Santrumpų, terminų sąrašas

angl. – anglų kalba

A, C, G, T – adeninas, citozinas, guaninas, timinas.

ATP – adenozinotrifosfatas.

bp – bazių pora.

‘Ca. P.’ – ‘Candidatus Phytoplasma’.

dNTP – deoksinukleozidtrifosfatas .

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis.

kbp – 1000 bazių porų.

pM – pikomolis.

MLO – į mikoplazmas panašus organizmas.

mM – milimolis.

PGR – polimerazinė grandininė reakcija.

rDNR – ribosominė DNR.

RFIP – restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmas.

rRNR – ribosominė RNR.

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletildiaminas

Tris – tris(hidroksimetil)aminometanas.

U – aktyvumo vienetas.

UDP – uridindifosfatas.

X-Gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozidas.

Bendra DNR – iš augalo/vabzdžio ląstelių išskirta bendra augalo/vabzdžio ir fitoplazmos DNR.

ĮVADAS

Geltligės – žinomos, kaip didelę žalą naudingiesiems augalams ir, savo ruožtu, didelius nuostolius žemės ūkiui padarančios ligos.

Ilgą laiką buvo manoma, jog geltligių sukėlėjai yra virusai. 1967 metais japonų mokslininkai naudodami elektroninės mikroskopijos metodus, pažeistų augalų audinių mikropjūviuose aptiko į mikoplazmas panašius organizmus (MLO). Šis atradimas atskleidė ne tik naują mikroorganizmų grupę, bet ir leido vėliau juos priskirti prie pagrindinių geltligių sukėlėjų (Doi et al., 1967; Bertaccini, Duduk, 2009).

Fitoplazmos – tai ląstelės sienelės neturinčios, *Mollicutes* klasei priklausančios, aptinkamos augalų karnienos bei vabzdžių pernešėjų audiniuose, augalų ligas sukeliančios, nekultivuojamos bakterijos. Šiuo metu pasaulyje yra nustatyta keli šimtai augalų rūšių, kurias pažeidžia būtent šie mikroorganizmai. Ypatingai daug žalos fitoplazmos padaro ūkiams užsiimantiems sumedėjusių augalų, tokių kaip: kokosinės palmės, vynuodžiai, kaulavaisiai, obelys auginimu (Bertaccini, Duduk, 2009). Bandymai įveikti šias infekcijas naudojant antibiotikus, termoterapiją, atkūrimą iš meristemų yra tik laikini, daug darbo bei lėšų reikalaujantys sprendimai, todėl efektyviausias kovos su fitoplazminėmis infekcijomis metodas vis dar yra augalų sunaikinimas arba prevencinis gausus pesticidų naudojimas siekiant sumažinti ar eliminuoti pernešėjų populiacijas bei piktžoles. Svarbu kuo daugiau išsiaiškinti apie šių bakterijų gyvybinius ciklus, plitimo aplinkoje ir augale kelius, gamtinius šeimininkus bei jų tarpusavio santykius, antropogeninių veiksnių įtaką. Išsiaiškinus šiuos aspektus bus įmanoma sukurti strategijas bei modelius, kaip sustabdyti ar sumažinti ligos plitimą, kaip efektyviai apsaugoti augalus, galbūt net pakeisti pačių augalų savybes (McCoy, Williams, 1982; Staniulis, 1988; Davis, Lee, 2000; Bove, Garnier, 2002; Bertaccini, 2007).

Lietuvoje fitoplazmų tyrimai pradėti prieš tris dešimtmečius (Staniulis, 1988). Per paskutiniuosius dešimtmečius, atsiradus pažangesniems molekulinės biologijos metodams, tapo įmanoma įvairiuose žoliniuose bei

sumedėjusiuose augaluose aptikti bei identifikuoti (pagal Lee et al., 1998a identifikacijos sistema) penkių grupių bei septyniolikos pograpių fitoplazmas (Staniulis et al., 2000; Jomantienė et al., 2000; 2002a, b; Samuitienė et al., 2002; Urbanavičienė et al., 2005; Valiūnas, 2003; Valiunas et al., 2000, 2001a, b, 2004; 2006, 2009, 2010). Šiame darbe pateikiami rezultatai apie naujai augaluose aptiktas fitoplazmas ir jų padėtį klasifikacinėje sistemoje. Taip pat nurodomi, kai kurių fitoplazmų galimi pernešėjai bei atliktų perkėlimo cikadelėmis bandymų rezultatai.

Darbo tikslas: aptikti ir identifikuoti Lietuvoje paplitusias fitoplazmas vabzdžiuose, surinktuose nuo įvairių augalų su fitoplazminiais simptomais ir nustatyti fitoplazmų vabzdžius pernešėjus bei atskleisti identifikuotų ir kitų fitoplazmų filogenetinius giminingumus.

Uždaviniai:

1. Apibūdinti galimus vabzdžius platintojus surinktus nuo augalų su išreikštais fitoplazminiais simptomais.
2. Naudojant lizdinės PGR, RFIP metodus nustatyti galimus fitoplazmų vabzdžius platintojus ir augalus šeimininkus.
3. Identifikuoti ir klasifikuoti fitoplazmas aptiktas surinktuose vabzdžių ir simptomatinių augalų pavyzdžiuose, atliekant 16S rRNR, *rp* ir *secY* genų sekų analizę.
4. Palyginti gautus duomenis su paskelbtais literatūros šaltiniuose.
5. Atlikti fitoplazmų pernešimo vabzdžiais bandymus siekiant nustatyti jų gebėjimą pernešti fitoplazmas tarp augalų, nuo kurių jie buvo surinkti.
6. Atlikti nuskaitytų 16S rRNR ir ribosominių baltymų genų filogenetinę analizę bei palyginti juos su kitų fitoplazmų genais esančiais internetinėse genų sekų duomenų bazėse.

Temos aktualumas

Fitoplazmų sukeltos naudingųjų augalų epidemijos gali atnešti didelius nuostolius agrarinių šalių ekonomikoms. Lietuvoje fitoplazmos pažeidžia tokius svarbius naudinguosius augalus kaip: avietės, avižos, miežiai, morkos, rapsai, svogūnai, taip pat nustatytos eilėje dekoratyvinių augalų

Lietuvoje jau žinomos keletas labiausiai paplitusių fitoplazmų grupių bei pogrupių, taip pat aptikta nemažai jų augalų-šeimininkų. Šiame darbe nustatytos fitoplazmos sukelia svarbių naudingųjų augalų: braškių, gelteklių, juodųjų serbentų, obelų, trešnių, vyšnių bei pramoninių augalų: pušų, eglių, pažeidimus bei epidemijas. Duomenų apie galimus šių bakterijų pernešėjus Lietuvoje beveik nėra. Pernešėjų identifikavimas ir tyrimas padės kurti veiksmingesnes strategijas bei sistemas kovai su fitoplazminėmis infekcijomis, leis anksčiau aptikti dar neatrastas ir galimai invazines fitoplazmas. Fitoplazmų ir jų pernešėjų identifikavimas suteiks svarbių duomenų tiriant šių patogenų ekologiją, paplitimą, kilmę, epidemiologiją, plitimo kelius. Informacija bus naudinga Lietuvos ir kaimyninių šalių augalų apsaugai (karantino įstaigoms), augalų augintojams. Taip pat galės padėti nustatant galimų invazinių vabzdžių rūšių bei fitoplazmų kamienų atsiradimą Lietuvoje dėl klimato kaitos.

Mokslinis darbo naujumas

Pietinės, vakarų ir centrinės Europos šalyse atliekamos išsamios studijos siekiant nustatyti fitoplazmų vabzdžius pernešėjus, tačiau rytų ir šiaurės Europos regione tokių tyrimų dar neatlikta, todėl Lietuvoje gauti rezultatai yra ypač vertingi siekiant nustatyti vabzdžių pernešėjų įvairovę ir fitoplazmų paplitimo tikimybę mūsų regione.

Fitoplazmos Lietuvoje tyrinėjamos jau trisdešimt metų. Pačioje tyrimų pradžioje šie patogenai bei jų platintojai buvo tyrinėjami nagrinėjant audinių ultrapjūvius elektroniniu mikroskopu, tačiau tai leido tik patvirtinti šias infekcijas ir nustatyti bakterijos morfologinius bruožus. Pritaikius molekulinės biologijos metodus tapo įmanoma tiksliai ir efektyviai aptikti bei klasifikuoti fitoplazmas, o taip pat nustatyti jų bioįvairovę ir paplitimą Lietuvoje. Šio darbo

metu pirmą kartą Lietuvoje molekuliniais metodais buvo išaiškinti fitoplazmų vabzdžiai pernešėjai. Daugelis aptiktų fitoplazmų pogrupių nustatytos identifikotuose vabzdžiuose pirmą kartą, kaip Lietuvoje taip ir pasaulyje. Dveiose vabzdžių rūšyse fitoplazmos aptiktos pirmą kartą Lietuvoje ir pasaulyje. Mūsų aptiktos naujos galimų vabzdžių pernešėjų rūšys suteikia naujų duomenų apie fitoplazmų platintojų spektrą mūsų regione. Penkiose augalų rūšyse fitoplazmos aptiktos pirmą kartą Lietuvoje. Darbo metu nustatytas vienas visiškai naujas Lietuvai ir pasauliui ir vienas naujas Lietuvai fitoplazmų pogrupiai bei jų augalai šeimininkai, kas prisideda prie Lietuvoje bei pasaulyje aptinkamų fitoplazmų paplitimo ir bioįvairovės tyrimo.

Ginamieji teiginiai:

1. Hemiptera būrio vabzdžiai yra potencialūs fitoplazmų pernešėjai Lietuvoje. Vienuolika identifikuotų vabzdžių rūšių yra galimi fitoplazmų pernešėjai Lietuvoje. Aptiktos penkios augalų rūšys yra nauji fitoplazmų šeimininkai Lietuvoje.
2. Aptiktos fitoplazmos priklauso 16SrI-A, B, C, 16SrIII-B, P, T ir 16SrXXI-A fitoplazmų pogrupiams.
3. Identifikuoti galimi vabzdžiai pernešėjai gali turėti platesnę pernešamų fitoplazmų įvairovę.
4. *E. incisus* Lietuvoje perneša fitoplazmas pagal klasifikacijos schemą priskirtas 16SrI-C fitoplazmų pogrupiui.
5. Identifikuotos fitoplazmos labiausiai giminingos 16SrI-A, B, C, 16SrIII-B, P, T ir 16SrXXI-A pogrupių fitoplazmoms aptiktoms Lietuvoje ir kitose šalyse.
6. 16SrIII-T ir 16SrIII-P pogrupių fitoplazmos gali priklausyti tai pačiai rūšiai.
7. Medienos indų ląstelių sultimis mintančios cikadelės, kaip ir karnienos indų ląstelių sultimis mintančios cikadelės sugeba įgyti fitoplazmas.

Darbo aprobavimas ir publikacijos

Disertacijos medžiaga buvo pristatyta dviejose tarptautinėse (Sitges Ispanija, Neustadt Vokietija) ir vienoje konferencijose (Vilnius) Lietuvoje. Tyrimų rezultatai publikuoti keturiuose moksliniuose straipsniuose (Plant disease, Bulletin of Insectology, Žemdirbystė) bei konferencijų tezėse.

Disertacijos struktūra

Disertaciją sudaro: Įvadas, Literatūros apžvalga, Medžiagos ir metodai, Rezultatai ir jų aptarimas, Išvados, 216 literatūros šaltinių sąrašas ir Mokslinių publikacijų sąrašas. Disertacijos apimtis – 133 puslapiai, 6 lentelės ir 45 paveikslai. Disertacija parašyta lietuvių kalba, santrauka – anglų kalba.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Fitoplazmų tyrimų apžvalga

Pirmosios užuominos apie fitoplazmų sukeltus augalų pažeidimus mus pasiekia iš senovės kinų metraščių bei japonų archyvų. Prieš tūkstantį metų Kinijoje Song dinastijos valdymo laikais (960-1227) „Yao-geltonieji“ veislės bijūnai buvo garbinami, dėl jų ypatingo grožio, tačiau augalai būdavo mažiau gyvybingi, o žalsvi žiedai nesubrandindavo sėklų (Wang, Maramorosch, 1998; Maramorosch, 2011). Kitos užuominos mus pasiekia iš Japonijos – šioje šalyje buvo aprašytos Paulovnijų „raganų šluotos“ (Paulownia Tengu-su – japoniškai; Tengu - mitinė japonų būtybė; goblinas) liga, kuri pasireikšdavo augalo žemaūge bei gausiu pridėtinių ir šoninių ūglių išvešėjimu (Hoshi et al., 2009). Taip pat šioje šalyje aprašyti vieni pirmųjų šilkmedžio žemaugės atvejų (1603 metai) (Okuda, 1972). Ilgai buvo manyta, jog geltligės yra virusinės kilmės ligos, dėl gaunamų neigiamų rezultatų filtruojant augalų audinių sultis per bakteriologinius filtrus (McCoy et al., 1989; Van der Want, Dijkstra, 2006). Geltligių sukėlėjų tyrimai atskleidė nemažai faktų apie jų biologines savybes. Pastebėta, kad jų inaktyvavimosi temperatūra (40°-50°C) yra žemesnė nei daugumos virusų (Kunkel, 1926; Staniulis, 1988). Kunkel (1926) pirmasis nustatė, kad šiuos sukėlėjus tarp augalų platina vabzdžiai. Maramorosch (1952) patvirtino, kad patogenas yra virusinės kilmės ir dauginasi vabzdžio organizme. Apie geltos sukėlėjų vabzdžius platintojus ir augalų šeimininkų ratą nemažai duomenų savo darbuose pateikė Valenta (1958), Musil, Mišiga (1961).

Tikroji geltligių sukėlėjo prigimtis buvo atskleista tik atsiradus ir ištobulinus elektroninės mikroskopijos metodus (Roingeard, 2008). Grupė japonų mokslininkų 1967 metais aptiko geltliges sukeliančius organizmus. Jie tai atliko tirdami pažeistų augalų karnienos audinių ultrapjūvius elektroninės mikroskopijos metodu. Naujai atrastiems organizmams, dėl jų panašumo į mikoplazmas, buvo suteiktas pavadinimas MLO – mycoplasma-like organisms

(liet. – į mikoplazmas panašūs organizmai) (Doi et al., 1967). Vėlesni tyrimai parodė, jog šie organizmai yra jautrūs tetraciklinui ir atsparūs penicilinui bei streptomycinui, kas vėliau leido šią savybę panaudoti MLO identifikavimui (Davis, Lee, 1982; Bertaccini, 2007; Maramorosch, 1958; 2011).

Tęsiant MLO tyrimus pavyko išaiškinti kitą augalų viduląstelinį patogeną – spiroplazmas. Jos taip pat priklauso *Mollicutes* klasei ir neturi ląstelės sienelės. Nuo MLO skiriasi spiraline ląstelės forma, kas yra keista savybė sienelės neturinčiom bakterijoms (Bove, Garnier, 2002). Pirmasis spiroplazmas atrado ir jas pradėjo auginti dirbtinėse terpėse R. E. Davis (Davis, Worley, 1973; Fletcher et al., 1998). Be sienelės neturinčių (MLO, spiroplazmos) augalų rėtiniuose induose taip pat buvo aptiktos ir ląstelės sienelę turinčios, Gram-neigiamos *Liberibacter* bei *Phlomobacter* genčių bakterijos (Bove, Garnier, 2002).

MLO sandaros bei vystymosi ypatumai yra tyrinėjami tik nagrinėjant augalų audinių ultrapjūvius elektroninės bei skenuojančios mikroskopijos metodais, kadangi dirbtinėse terpėse kultivuoti jų nepavyksta (Staniulis, 1988; Lee et al., 1998). Laboratoriniams bandymams MLO saugomos augalų audinių kultūrose, nuolat apkrečiant sveikus augalus arba užšaldytuose infekuotuose vabzdžiuose bei augaluose (Staniulis, 1988).

Pirmosios šių mikroorganizmų klasifikacijos schemas buvo sudarinėjamos remiantis jų specifinių augalų-šeimininkų, vabzdžių platintojų, sukeltamų simptomų augaluose pagrindu (McCoy et al., 1989; Davis, Lee, 2000; Gasparich, 2009).

Ilgą laiką MLO aptikimui infekuotuose augaluose bei pernešėjuose buvo naudojami DNR-DNR homologijos bei serologinio reakcingumo pagrindu sudaryti metodai, kuriuose naudojami specifiniai klonuoti MLO DNR fragmentai, mono- ir polikloniniai antikūnai. Infekuotų augalų ląstelių nustatymui naudojami DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindolas) bei Diene dažai. DAPI dažymas specifinis nukleorūgštims, o Diene dažas – MLO metabolitams. Taip pat serologiniais metodais buvo koncentruojamos patogeno ląstelės, kurių DNR buvo panaudojama tolimesniuose tyrimuose (Deeley et al., 1979; Jiang,

Chen, 1987; Sinclair, 1989; Malinowski et al., 1996; Lee et al., 1998; Davis, Lee, 2000; Bertaccini, 2007).

Ištobulinti DNR analizės metodai tokie, kaip PGR, RFIP bei filogenetinė analizė leido daug efektyviau bei tiksliau ištirti MLO savybes bei santykį su kitais mikroorganizmais. Šiais metodais atlikus 16S rRNR ir ribosominių baltymų genų analizę, šie organizmai buvo išskirti į didelę monofiletinę grupę *Mollicutes* klasėje (Lee et al., 2000; Bove, Garnier, 2002; Davis, Bertaccini, 2007). MLO buvo priskirti *Mollicutes* klasei pagal tam tikras šiai klasei būdingas savybes tai – ląstelės sienelės nebuvimas, panašus guanino (G) – citozino (C) santykis DNR, genomo dydžių panašumas, 16S rRNR genų sekų palyginimas išskyrė jas į grupę *Mollicutes* klasėje bei parodė filogenetinį giminingumą su *Acholeplasma/Anaeroplasma* grupe; UGA kodonas naudojamas ne triptofanui koduoti, o kaip terminacinis, kas leidžia manyti, jog jos ir acholeplazmos kilme yra senesnės nei spiroplazmos (Bove, Garnier, 2002; Bai et al., 2006).

Surinkus pakankamai duomenų bei įrodymų apie MLO savybes išskiriančias jas tarp kitų *Mollicutes* atstovų, fitoplazmų tyrimo grupė, atstovaujanti palyginamosios mikoplazmologijos tarptautinį tyrimų projektą (IRPCM), sutiko 1992 metais pavadinimą „fitoplazma“ panaudoti šiai grupei priklausančių bakterijų identifikavimui bei esamos padėties aprašymui, o 1994 metais pavadinimas „fitoplazma“ buvo oficialiai priimtas vietoj „MLO“ (Bove, Garnier, 2002).

Iki šiol nepavyko auginti fitoplazmų dirbtinėse terpėse, todėl jų klasifikacija remiasi 16S rRNR, 16S/23S tarpgeninės srities rDNR, ribosominių baltymų, elongacijos faktoriaus, sekretinės sistemos genų sekų analize (Davis, Lee et al., 2000). Šių genų sekų padauginimui naudojamas lizdinės PGR metodas, kuris sudarytas iš dviejų etapų. Per pirmąjį etapą gautos tam tikros DNR sekos kopijos panaudojamos antrajame, kur nuo jų pagausinami mažesni šių sekų fragmentai, todėl padidėja metodo jautrumas, kas leidžia aptikti fitoplazminę DNR bendrame DNR tirpale su mažu jos kiekiu jame. Tai palengvino fitoplazmų aptikimą sumedėjusiuose augaluose bei

augaluose apkrėstuose keliomis fitoplazmomis (Lee et al., 1998; Davis, Lee, 2000).

Tobulėjant ir gilėjant žinioms apie DNR ir jos analizės metodus, tapo įmanoma vis detaliau aprašyti fitoplazmų molekulinis bei filogenetinius bruožus, todėl Miurėjus ir Schleiferis 1994 metais pasiūlė laikiną „*Candidatus*“ statusą galimų naujų nekultivuojamų taksonų genties ir rūšies lygmenyje aprašymui (Bove, Garnier, 2002), kas vėliau leido fitoplazmas išskirti į atskirą *Mollicutes* klasės *Acholeplasmataceae* šeimos `Candidatus Phytoplasma' gentį (Bove, Garnier, 2002; Bai et al., 2006).

1.2. Fitoplazmų platintojai

Pirmieji duomenys apie fitoplazmų platintojus sutinkami darbuose nagrinėjančiuose geltligių pernešimo mechanizmus, kai dar buvo manoma, jog jas sukelia virusai. 1883 metais buvo išsiaiškinta, kad ryžių žemaūgės sukėlėją perneša cikadelės, o Kunkel'is iš Boyce Thompson instituto 1924 metais nustatė, kad *Macrostelus fascifrons* cikadelė sugeba pernešti astrų geltos sukėlėją iš vieno augalo kitam, bet neradęs jokių bakterijų ar grybų buvimo augaluose požymių, manė, jog kaltininkas yra virusinės kilmės (Zaitlin, Palukaitis, 2000; Maramorosch, 2011). Nuo to laiko buvo atlikta gausybė pernešimo tyrimų siekiant nustatyti galimus pernešėjus, tačiau molekulinį metodų nebuvimas bei rėmimasis tik simptomais nustatant galimą sukėlėją paliko daug neaiškumų ir buvo klaidinantys. Modernūs molekulinės biologijos metodai leido tiksliai įvertinti, kokius fitopatogenus sugeba pernešti tiriamas pernešėjas (Weintraub, Beanland, 2006). Šiandien žinoma, kad pagrindiniai fitoplazmų platintojai yra *Hemiptera* būrio vabzdžiai, mintantys augalų karnienos sultimis bei laidžiųjų audinių ląstelėmis. Gamtoje šias bakterijas gali platinti ne vien vabzdžiai, bet ir parazitinis augalas – brantas (*Cuscuta* spp.). Tyrimuose brantas naudingas tuo, kad sugeba pernešti fitoplazmas tarp taksonomiškai tolimų augalų rūšių. Tokiu būdu fitoplazmas galima perkelti

nuo sumedėjusių augalų ant parankesnių, lengviau auginamų augalų – žieminių (*Catharanthus roseus* (L.) G.Don). Infekciją gali platinti žmogus skiepijant arba platindamas vegetatyvinius augalų sodinukus (Staniulis, 1988; Lee et al., 2000). Manoma, jog fitoplazmos negali plisti sėklomis dėl sėklų dehidratacijos sukeliama patogeno žūtis bei karnienos indų nekontaktavimo su bręstančiu gemalu, tačiau fitoplazmos buvo aptiktos kokoso riešuto bei liucernos sėklų gemaluose, o iš jų išaugę augalai turėjo geltligių simptomų, tačiau to neužteko įrodyti, jog šie organizmai gali plisti sėklomis (Weintraub, Beanland, 2006; Bertaccini, 2007).

Hemiptera tai didelis bei įvairius būrys, kurį sudaro daugiau nei 50000 rūšių, tačiau fitoplazmų pernešėjai aptinkami tik keliose šeimose: *Cercopidae*, *Cicadellidae*, *Cixiidae*, *Delphacidae*, *Derbidae* ir *Psyllidae*, iš *Auchenorrhyncha* ir *Sternorrhyncha* pobūrių (1.1. pav.) (Weintraub, Beanland, 2006; Bosco, D'Amelio, 2010; Weintraub, Wilson, 2010). Didžiausią platintojų grupę sudaro vabzdžiai iš *Membracoidea* antšeimio, kurioje visi iki šiol žinomi platintojai aptinkami *Cicadellidae* šeimoje. Šioje šeimoje daugiau nei 75 procentai visų patvirtintų pernešėjų randami *Deltocephalineae* pošeimyje, kurį sudaro mono- ir oligofagai sugebantys pernešti daugiau nei vieną fitoplazmų rūšį. Šie vabzdžiai gausiai paplitę žolinėse ekosistemose, tačiau yra žinomi pernešėjai iš *Opsini*, *Macrostelini*, *Scaphodeini*, *Scaphyopiini* tribų, kurių gyvybiniai ciklai nėra susiję su žoliniais augalais. *Macropsinae* pošeimis iš *Cicadellidae* šeimos užima antrą vietą pagal patvirtintų pernešėjų skaičių. Šio pošeimio atstovai dažniausiai minta ant sumedėjusių augalų. Fitoplazmų pernešėjai aptinkami keturiose šeimose įeinančiose į *Fulgoromorpha* infrabūrį: *Cixiidae*, *Delphacidae*, *Derbidae* ir *Flatidae*. Pirmos trys šeimos turi bent po vieną rūšį pernešančią palmių mirtinosios geltligės fitoplazmų grupės fitoplazmas, bei keletą rūšių pernešančių stoburo grupės (STOL) fitoplazmas. *Flatidae* šeima turi tik vieną patvirtintą rūšį *Metcalfa pruinosa* (Say) platinančią astrų geltos fitoplazmas. Šiuo metu tik dvi gentys iš *Psyllidae* šeimos turi patvirtintus pernešėjus. Keli *Cacopsylla* spp. atstovai patvirtinti, kaip obelų proliferaciją sukeliančių

fitoplazmų pernešėjai, platinantys šias fitoplazmas tarp obelų ir kaulavaisių. Antra iš paminėtų genčių turi tik vieną patvirtintą rūšį

Būrys *Hemiptera*

Pobūris *Auchenorrhyncha*

Antšeimis *Cercopoidea*

Šeima *Cercopidae*

Antšeimis *Membracoidea*

Šeima *Cicadellidae*

Pošeimis *Deltocephalinae*

Pošeimis *Macropsinae*

Antšeimis *Fulgoroidea*

Šeima *Cixiidae*

Šeima *Delphacidae*

Šeima *Derbidae*

Šeima *Flatidae*

Pobūris *Sternorrhyncha*

Antšeimis *Psylloidea*

Šeima *Psyllidae*

Pobūris *Coleorrhyncha*

Pobūris *Heteroptera*

1.1. pav.: Fitoplazmų vabzdžių pernešėjų taksonominė padėtis pagal ITIS (Integrated Taxonomic Information System) duomenų bazę, <http://www.itis.gov>.

Bactericera trigonica Hodkinson (Font et al., 1999) pernešanti stoburo fitoplazmas morkose (Weintraub, Beanland 2006; Weintraub, Wilson, 2010).

Fitoplazmas pernešantys vabzdžiai tapo puikiais fitoplazmų platintojais dėl šių savybių: (a) suaugėliai bei nimfos maitinasi tose pačiose vietose bei tuo pačiu būdu ir abiejose stadijose gali pernešti fitoplazmas, (b) maitinasi tik ant specifinių augalų ir specifiniais augalo audiniais, nepažeisdami laidžiųjų audinių bei nesukeldami imuninio atsako, (c) fitoplazmos juose nuolat gyvena ir dauginasi; (d) vabzdžiuose aptinkami obligatiniai, simbiotiniai prokariotai,

kurie gali būti perduoti palikuonims transovariniu keliu, tuo pačiu keliu gali būti perduotos ir fitoplazmos (Weintraub, Beanland, 2006; Weintraub, Wilson, 2010).

Fitoplazmos aptinkamos augalo karnienos audiniuose. Jų pernešėjai yra prisitaikę misti karnienos sultimis, tačiau grupės mintančios karniena, mediena ar parenchima (Tonkyn, Whitcomb, 1987) nėra griežtai apibrėžtos (Bosco, D'Amelio, 2010). Riba atskirianti karniena mintančius vabzdžius nuo mediena mintančių gali būti labai neaiški - ypatingai tarp laidžiųjų audinių ląstelėmis mintančių cikadelių (Wayadande, 1994). Maitinimasis karniena yra viena iš sąlygų lemiančių gebėjimą jas pernešti, tačiau atmesti galimybės, kad mediena mintantys vabzdžiai irgi gali būti pernešėjais, negalima (Bosco, D'Amelio, 2010). Tai patvirtino Crews et al. (1998) tyrimai, kurie parodė, kad *Philaenus spumarius* rūšies cikadelės (medienos ląstelių sultimis mintančios), gali pradurti karnienos ląsteles ir turi galimybę įsiurbti jų sulčių. Rosa et al. (2014) patvirtino, kad medienos sultimis mintančios cikadelės (*Lepyronia quadrangularis*) gali pernešti fitoplazmas. Iš kitos pusės, nemažai amarų ir baltasparnių rūšių minta fitoplazmomis infekuotų augalų karnienos ląstelių sultimis, bet eksperimentiškai įrodyta, kad pernešti fitoplazmų negali (Cainelli et al., 2007). Apibendrinus, maitinimasis karniena nebūtinai yra lemiančiu veiksniumi pernešant šias bakterijas (Bosco, D'Amelio, 2010).

Laboratorinėmis sąlygomis bandyminį augalą žiemę (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) įmanoma infekuoti daugeliu fitoplazmų kamienų priklausančių skirtingoms grupėms. Gamtoje fitoplazmų augalų-šeimininkų spektras apsprendžiamas vabzdžio maitinimosi įpročiais ir augalų šeimininkų rato dydžiu, todėl jie skirstomi į polifagus, oligofagus ir monofagus. Plataus fitoraciono vabzdžiai yra itin problematiški, nes gali paskleisti bakterijas plačiame augalų diapazone. Maitindamiesi ant augalų, kurie gali įeiti į kitų pernešėjų maitinimosi racioną, dar labiau praplatina fitoplazmų augalų ir vabzdžių šeimininkų ratą (Bosco, D'Amelio, 2010). Fitoplazmos gali būti aukšto arba žemo specifiškumo šeimininkui (Davis, Lee, 2000). Astrų geltos fitoplazmos pernešamos dešimčių vabzdžių rūšių ant šimtų augalų rūšių (Lee et

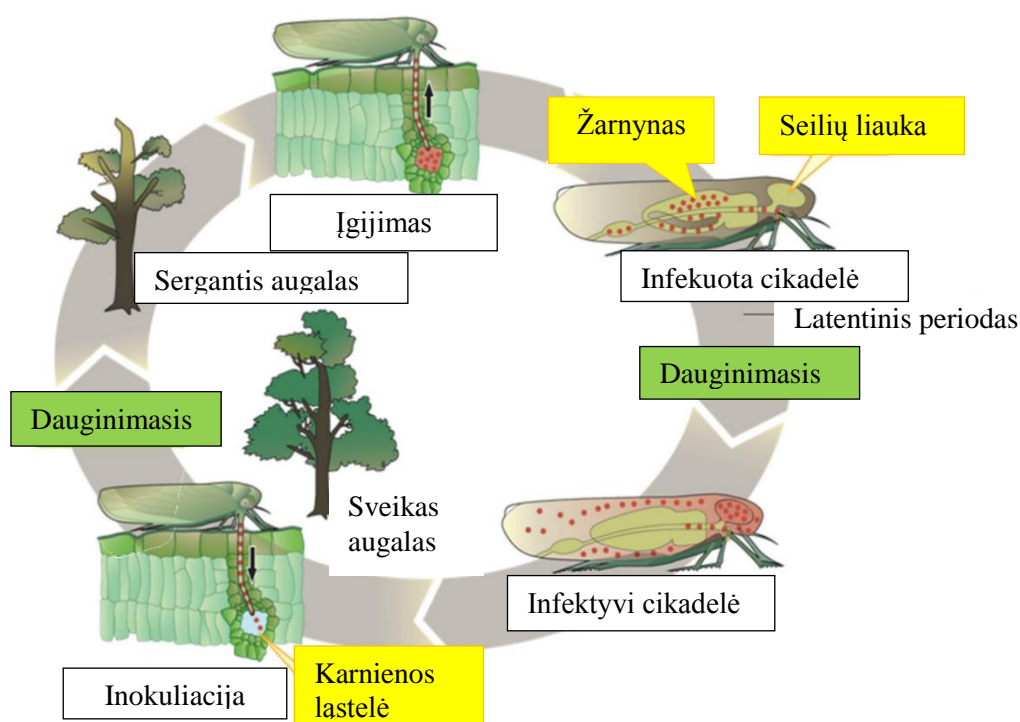
al., 2000), o „flavescence doree“ fitoplazma pernešama tik *Scaphoideus titanus* Ball ant vynuodžių (Schvester et al., 1963). Šios bakterijos taip pat skirstomos į aukšto specifiškumo pernešėjui ir žemo augalui (runkelių-cikadelių-pernešamas pageltimas; angl. - beet-leafhopper-transmitted virescence (BLTV)) bei atvirkščiai žemo specifiškumo pernešėjui ir aukšto augalui (obelų proliferacijos fitoplazma) (Weintraub, Beanland, 2006; Weintraub, Wilson, 2010). Tokie susiraizgę fitoplazmų ir jų šeimininkų ryšiai apsunkina jų tyrinėjimą, todėl manoma, jog atrasti nauji pernešėjai ir augalai šeiminikai gali nesutapti arba prieštarauti duomenims apie šiuo metu žinomus šeimininkus (Bosco, D'Amelio, 2010).

Pernešimo specifiškumą taip pat lemia ir geografiniai veiksniai. Dažnai introdukuotos invazinės augalų ir vabzdžių rūšys sukelia didelės žalos vietinėms ekosistemoms bei ūkiui. *S. titanus* vabzdžių paplitimas pietų Europos vynuogynuose lėmė epideminį „flavescence doree“ fitoplazmos paplitimą, o *Euscelidius variegatus* Kirschbaum itrodukuotas Šiaurės Amerikoje tapo X-ligos bei Amerikos astrų geltos pernešėju. Todėl galima manyti, kad geografiškai atskirti ir dar nežinomi, kaip pernešėjai vabzdžiai turi potencialą jais tapti (Bosco, D'Amelio, 2010; Weintraub, Wilson, 2010).

1.3. Fitoplazmų ir šeimininkų sąveikos bei simptomai

Fitoplazmos neauga dirbtinėse terpėse, kas apsunkina jų patogenezės bei patekimo ir plitimo vabzdyje mechanizmų tyrimus. Spiroplazmos yra filogenetiškai ir morfologiškai artimos fitoplazmoms bakterijos, kurios yra kultivuojamos *in vitro* ir sukelia panašius ligų simptomus augale, todėl duomenys gauti tyrinėjant šiuos organizmus naudojami sudarant hipotetines fitoplazmų patogenezės schemas. Manoma, jog spiroplazmos vabzdžiuose įveikia žarnyno ir seilių liaukų barjerus dėka specifinių paviršinių membranos baltymų, kurie sąveikaudami su šeimininko ląstelių receptoriais inicijuoja patogeno ląstelių pernašą endocitozės būdu (Fletcher et al, 1998; Bai et al.,

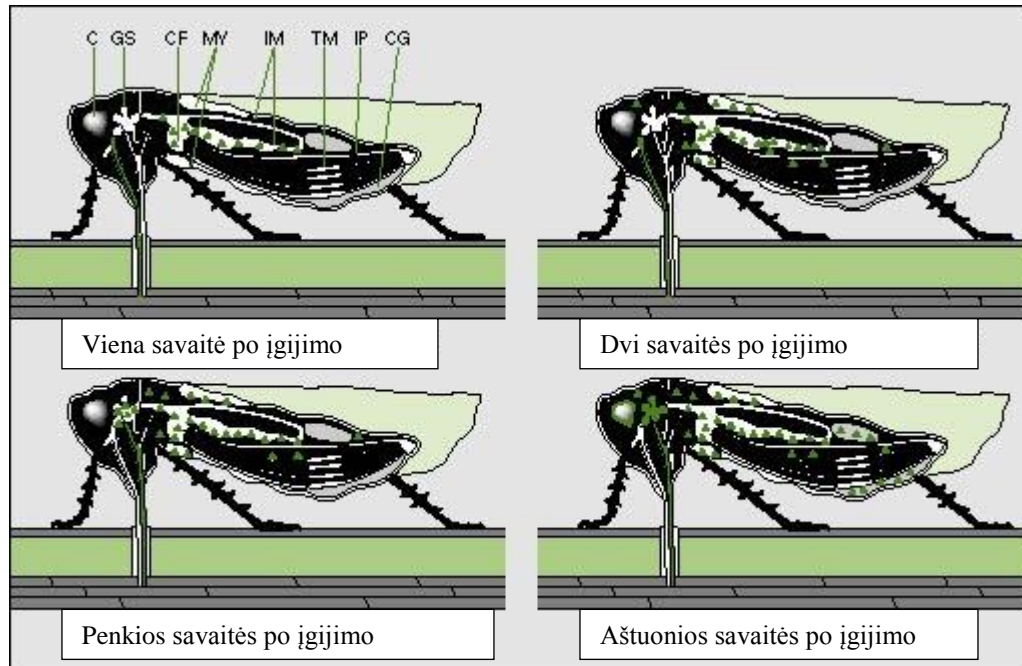
2006; Gasparich, 2009). Taip pat nustatyta, kad fitoplazmų ląstelės prisijungia prie pernešėjų ląstelių išskirtų iš žarnyno, seilių liaukų ar hemolimfos, bet nereaguoja į raumenų ar lytinių organų ląsteles. Daug tyrimų atliekama su fitoplazmų membraniniu Amp baltymu. Nustatyta, kad šis baltymas gali specifiskai jungtis su pernešėjo mikroplaušelių kompleksu, sudarytu iš aktino ir miozino, bei dar trimis baltymais (Lefol et al., 1993; Suzuki et al., 2006; Galetto, et al., 2008; Marcone, 2012). Iš to galima spręsti, kad fitoplazmų pernešimo specifiskumas priklauso nuo fitoplazmų gebėjimo atpažinti ir prisitvirtinti prie pernešėjo ląstelinių membranų, tačiau to dar neužtenka, tam



1.2. pav.: Fitoplazmų gyvybinis ciklas. Apskritimai vaizduoja fitoplazmas. Oshima et al., 2011.

kad fitoplazma būtų sėkmingai pernešta. Fitoplazmų gyvybinis ciklas (1.2. pav.) prasideda, kai vabzdys pradeda maitintis ant užkrėsto augalo. Vabzdys turi maitintis tam tikrą laiko tarpą vadinamą įgijimo periodu, kuris gali trukti nuo kelių minučių iki valandų, kuo ilgesnis periodas tuo didesnę titrą bakterijų pasisavina pernešėjas ir tuo didesnę įgijimo tikimybę. Po to seka latentinis arba inkubacinis periodas, per kurį fitoplazmos pasidaugina vabzdžio organizme (1.3. pav.). Inkubacinio periodo pabaigoje, kuris yra priklausomas nuo

temperatūros ir šeimininko gali trukti nuo keleto iki 80 dienų, pernešėjas įgyja gebėjimą platinti fitoplazmas, bet yra duomenų įrodančių, kad vabzdžiai,



1.3. pav.: Fitoplazmų judėjimas ir dauginimasis vabzdžio viduje (Lefol et al., 1994).

C - smegenys ; GS - seilių liaukos ; CF - filtravimo kamera ; MY - micetoma; IM – vidurinė žarna; TM – Malpigijaus vamzdeliai; IP – galinė žarna; CG – riebalinis kūnas. Trikampiai vaizduoja fitoplazmas.

kuriuose šie mikroorganizmai sugeba daugintis nebūtinai yra infektyvūs (Vega et al., 1993; Weintraub, Beanland, 2006; Bosco et al., 2007; Weintraub, Wilson, 2010). Manoma, kad sėkmingą dauginimąsi šeimininko organizme lemia prisitaikymas prie jo imuninės sistemos bei seilių liaukų barjero sudaryto net iš trijų komponentų (bazalinio lakšto, bazalinės plazmalemos ir apikalinės plazmalemos). Nepernešančiuose vabzdžiuose fitoplazmų titras seilių liaukose būna žymiai mažesnis (apie 700 ląstelių nanogramui vabzdžio DNR išskirtos iš jo galvos) nei pernešančiuose (4000-8000 ląstelių) (Galletto et al., 2009; Bosco, D'Amelio, 2010). Įveikus visas šias kliūtis ir patekus į augalą yra tikimybė, kad fitoplazma toliau nebus platinama, nes pateko į „akligatvinių“ (angl. - dead end) šeimininką. Manoma, jog tai susiję su netolygiu fitoplazmų pasiskirstymu tokiam augale, skirtingu maitinimosi pobūdžiu ant skirtingų augalų ar

fitoplazmų sukeliama biocheminiu disbalansu (Choi et al., 2004; Weintraub, Beanland, 2006; Bosco, D'Amelio, 2010).

Pernešėjai besimaitindami ant skirtingų ar net to pačio augalo turi galimybę įgyti daugiau nei vieną fitoplazmą, kas sukelia konkurencinę įtampą tarp bakterijų dėl vidinių išteklių. To rezultate pernešėjas ir patogenas gali visiškai specializuotis. Taip pat pernešėjas infekuotas viena fitoplazma gali tapti atsparus kitų fitoplazmų infekcijai. Platintojai pernešantys daugiau nei vieną fitoplazmą, dėl skirtingų latentinių periodų bei pačių bakterijų skirtingo virulentiškumo laipsnio, turi skirtingus jų pernešimo pobūdžius. Kuo trumpesnis periodas ir virulentiškesnis organizmas, tuo jis efektyviau pernešamas (Bosco, D'Amelio, 2010).

Fitoplazmų poveikis pernešėjo organizmui gali būti įvairus, manoma, jog tai priklauso nuo sąveikos tarp vabzdžio ir šių mikroorganizmų trukmės. Nustatyta, kad tam tikros grupės fitoplazmos infekavusios kai kuriuos vabzdžius gali sutrumpinti jų gyvenimo trukmę ir sumažinti vislumą, tačiau yra duomenų ir apie tai, jog fitoplazmos pailgino pernešėjo gyvybiškumą ir padidino vaisingumą (Weintraub, Beanland, 2006, Marcone, 2012). Taip pat išskeltos teorijos, kad šie patogenai pakeičia augalą tokiu būdu, kad jis taptų labiau tinkamu vabzdžiui. Infekuotas augalas turi susilpnintą gynybos sistemą, todėl sunkiau gali apsisaugoti nuo juo mintančių vabzdžių. Infekcija padidina laisvųjų amino rūgščių bei cukraus kiekį augale, kurie yra puikus, lengvai virškinamas maistas pritraukiantis vabzdžius (Weintraub, Beanland, 2006). Pastebėta, kad pageltę augalai labiau pritraukia cikadeles. Manoma, kad dėl fitoplazminės infekcijos sukulto pageltimo augalas tampa patrauklesnis pernešėjui (Todd et al., 1990). *Candidatus* *Phytoplasma mali* apkrestos obelys išskiria allomonus (medžiagos panašios į feromonus), kurie privilioja daugiau vabzdžių (*Cacopsylla picta*), kas padidina pernešimo tikimybę (Mayer et al., 2008).

Nustatyta, kad vabzdžio lytis bei amžius turi didelę įtaką fitoplazmų pernešimo efektyvumui. Moteriškos arba vyriškos lyties cikadelės yra efektyvesni pernešėjai, priklausomai nuo pernešėjo rūšies (Weintraub,

Beanland, 2006). Tai grindžiama vabzdžių elgesio skirtumais ant augalo šeimininko. Patinėliai ant augalo ir nuo augalo ant kito augalo migruoja daug dažniau (Hunt et al., 1993). Pirmos stadijos vabzdžių platintojų nimfos žymiai sunkiau įgyja fitoplazmas nei penktos stadijos nimfos. Pirmų stadijų nimfos yra pernelyg gležnos tam, kad įveiktų augalo audinius ir galėtų pilnavertiškai maitintis (Palermo et al., 2001). Tai pat nustatyta atvejų, kai fitoplazmų pernešimo efektyvumas padidėja tuomet, kai jas įgyja nimfos, o ne suaugėliai (Murrall et al., 1996.).

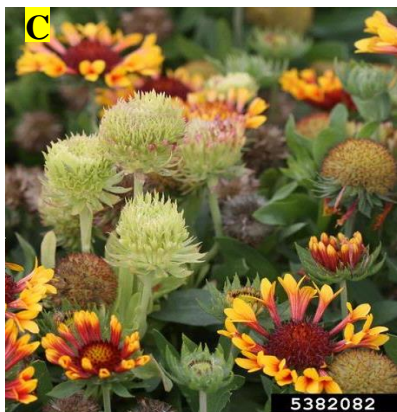
Vabzdžių judėjimas ekologinėje erdvėje bei agrokraštovaizdis turi žymią įtaką pernešėjų bei fitoplazmų sklidimui, todėl į juos būtina atsižvelgti sudarant fitoplazmų plitimo schemas (Tschardt, Brandl, 2004). Tokiose schemose matoma, jog tokie veiksniai, kaip laikas, vieta, patogenas ir pernešėjas turi sutapti bei atitikti, kitaip schema yra neveiksni. Nustatyta, kad tarp miško ir dirbamų laukų pereinamųjų juostų augalų bei vabzdžių-plėšrūnų sudėtis apriboja kai kurių cikadelių sklidimą (Nicholls et al, 2001), tačiau tuo pačiu ir sudaro sąlygas kitoms plisti (Irwin et al., 2000). Vienos cikadelių rūšys, padedant vėjui, sugeba migruoti milžiniškus atstumus, taip paskleisdamos patogenus plačiose teritorijose. Kitos maitinasi tam tikrą laiko tarpą ant vieno augalo, kol gauna impulsą pradėti migraciją (Weintraub, Beanland, 2006). Tankus augalų-šeimininkų išsidėstymas gali lemti, kad pernešėjas turės mažesnę stimulą ieškoti kitų augalų, tačiau dažniau judės tarp jų (Power, 1992). Visa tai parodo sistemų veiksnių įvairovę ir svarbą tiriant patogeno plitimą (Weintraub, Beanland, 2006).

Augaluose fitoplazmos aptinkamos rėtiniuose induose bei rėtinių indu lydimosiose ląstelėse, tačiau jų pasiskirstymas visame augale yra nevienodas ir svyruoja priklausomai nuo aplinkos sąlygų (Bertaccini, Duduk, 2009).

Fitoplazmų neaugimas dirbtinėse terpėse apsunkina jų patogeniškumo bei patogenezės tyrimus. Jų svarbą ligos vystymuisi pavyko įrodyti nustačius: bakterijų lokalizaciją augalų audiniuose, juose sukeliamas patogeninės reakcijas, ligos simptomų vystymasis perkėlus fitoplazmas į sveikus augalus

bei ligos simptomų sušvelnėjimas ir fitoplazmų nykimas naudojant tetracikliną ir termoterapiją (Davis et al., 1996; Davis, Lee, 2000).

Infekuotame augale fitoplazmos sukelia augalo pageltimą (yellowing) (1.4. pav. B), augimo sulėtėjimą (stunt), lapo gyslų nekrozę ir chlorozę, žiedlapių pažaliavimą (virescence) (1.4. pav. D), gausiai susidaro papildomi šoniniai ūgliai, išsivysto vadinamosios „raganų šluotos“ (witch’s-broom) (1.4. pav. A), filodiją (phyllody) (1.4. pav. C), kai vietoje žiedlapių vystosi vegetatyviniai lapeliai, mažesnių lapų išsivystymą (little leaf) (Bos, 1957; Lee



1.4. pav.: **A** – uosių (*Fraxinus americana* L.) „Raganų šluotos“ (witch’s-broom). (Pagal William Jacobi, Colorado State University, Bugwood.org)
B – kokosinių palmių (*Cocos nucifera* L.) pageltimas (yellowing). (Pagal Monica Elliott, University of Florida, Bugwood.org)
C – kosmėjų (*Cosmos spp.* Cav.) žiedų filodija (phyllody). (Pagal Whitney Cranshaw, Colorado State University, Bugwood.org)
D – hortenzijų (*Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.) žiedlapių pažaliavimas (virescence). (Pagal Shigetou Namba, Suzuki et al., 2006.)

et al., 1998; Davis, Lee, 2000). Manoma, kad tokio pobūdžio simptomai augaluose-šeimininkuose išsivysto dėl hormonų balanso sutrikimo (Davis, Lee, 2000), pavyzdžiui, fitoplazmų sukeltą augalų žemaūgiškumą galima gydyti giberelino rūgštimi, kas rodo sutrikdytą giberelino (augalinis hormonas) pusiausvyrą augale (Maramorosch, 1957).

Spiroplazmos yra filogenetiškai bei struktūriškai artimos fitoplazmoms. Taip pat šios bakterijos aptinkamos augalų karnienos ląstelėse ir vabzdžių audiniuose bei sukelia panašius į fitoplazmų ligų simptomus. Jos yra auginamos dirbtinėse terpėse, todėl jų tyrimai gali padėti atskleisti fitoplazmų patogenezės augaluose principus. Paaiškėjo, jog spiroplazmos pasisavina nemažą dalį augalo fruktozės išteklių. Augalo ląstelės fruktozę panaudoja sacharozės pernešimui į rėtinius indus, o spiroplazmos - kaip anglies šaltinį. Nustatyta, kad fruktozė indukuoja spiroplazmų genų ekspresiją, kurių produktai slopina augalų genus, atsakingus už angliavandenių transportą, fotosintezę, fitosterolių biosintezę (steroidinių augimo reguliatorių pirmtakai) (Jagoueix-Eveillard et al., 2001; Bai et al., 2006).

Kelių fitoplazmų genomų sekų palyginimas atskleidė, jog šie mikroorganizmai stokoja svarbių metabolizmo genų ir turi nemažai genų koduojančių transportines sistemas. Manoma, kad daugelis reikalingų metabolitų yra pasisavinami iš šeimininko ląstelių citoplazmos, taip sutrikdant metabolizmą ląstelėse. Be to, transportinės sistemos gali sekretuoti įvairius toksinus bei kenksmingus šeimininkui baltyminius junginius, kas sužadina imuninę augalo sistemą (Oshima et al., 2004; Bai et al., 2006).

Nors fitoplazmos nekultivuojamos, tačiau įmanoma ekspresuoti jų baltymus ląstelių kultūrose bei augaluose. Tokiu būdu galima tirti pasirinktų baltymų savybes ir jų poveikį bei sudėlioti juos į galimą patogenezės mechanizmo grandinę. Jau atrasta keletas baltymų, kurie galėtų būti atsakingi už fitoplazmų patogeniškumą: TENGU, SAP11, SAP54, imunodominantiniai membraniniai baltymai (angl. - immunodominant membrane proteins-IDPs) (Kakizawa et al., 2006a; Hogenhout et al., 2008; Bai et al., 2009; Hoshi et al., 2009.; MacLean et al., 2011; Sugio et al., 2011). TENGU (~4,5kDa) baltymo

dalyvavimas sukeliant hormoninius pažeidimus augale jau įrodytas. Augaluose šis baltymas sukelia stiebų sutrumpėjimą bei raganų šluotas. Jo veikimas pagrįstas auksinų biosintezės bei signalų perdavimo kelių blokavimu, tai buvo įrodyta stebint su auksino gamyba susijusių genų raiškos lygius mikrogardelių metodu (Hoshi et al., 2009). SAP11 baltymo vaidmuo patogenezėje dar nežinomas, tačiau žinoma, jog šis baltymas yra vienas iš 56 *Candidatus Phytoplasma asteris* sekretuojamų baltymų, atsakingų už sąveiką su augalo ir vabzdžio ląstelėmis, kuris turi signalinį peptidą nukreipiantį šį baltymą į augalinės ląstelės branduolį. Manoma, jog branduolyje šis baltymas vienas ar komplekse su kitais fitoplazmos baltymais keičia įvairių šeimininko genų ekspresiją (Bai et al., 2009). IDP baltymai sudaro didžiąją dalį visų membraninių fitoplazmų baltymų ir dalinami į tris skirtingus tipus: imunodominantiniai membranų baltymai (Imp), imunodominantiniai membranų baltymai A (IdpA) ir antigeniniai membranų baltymai (Amp). Visi šie baltymai atsakingi už sąveiką tarp šeimininko ląstelių ir fitoplazmos (Barbara et al., 2002; Kakizawa et al., 2006ab). Be to, nustatyta, kad fitoplazmų Amp baltymai gali sąveikauti su vabzdžio žarnyno mikrofilamentų kompleksais. Manoma, kad šių elementų sąveika lemia fitoplazmų pernešamumą vabzdžiuose (Suzuki et al., 2006).

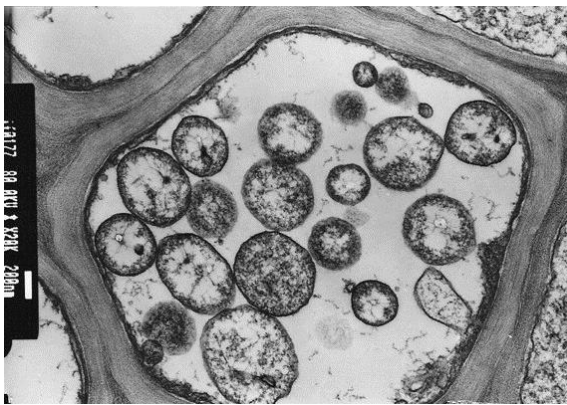
Augalo meristeminių ląstelių likimas nulemia jo organų formavimosi pobūdį bei viso augalo morfotipą. Genetiškai nustatyti pokyčiai sąlygoja laipsnišką meristeminių ląstelių perėjimą nuo vegetatyvinių link generatyvinių organų formavimo (Kater et al., 2006). Manoma, kad įprastomis sąlygomis šis procesas yra negrįžtamas (Levy, Dean, 1990). Nustatyta, kad fitoplazmos gali sustabdyti procesus, vykstančius meristeminiuose ląstelėse kurie lemia augalo perėjimą link žydėjimo ir aktyvinti grįžimą prie vegetatyvinio augimo. Pastebėta, kad išsivysto skirtingi ligos simptomai, priklausomai nuo to, kada meristemines ląstelės buvo paveiktos (Wei et al., 2013).

Manoma, jog fitoplazmų sukelti simptomai padeda joms plisti, nes įrodyta, kad vabzdžiai minta bei deda kiaušinius dažniau ant jaunų žalių arba pageltusių augalo organų. Be to, atlikti bandymai, kurių metu nustatyta, jog

fitoplazmos gali praplėsti vabzdžio racioną padidindamos augalo tinkamumą jo mitybai (Hogenhout et al., 2008; Hoshi et al., 2009).

1.4. Fitoplazmų morfologija ir genomas

Fitoplazmų ląstelės (1.5. pav.) padengtos tik trisluoksne elementariąja membrana. Ląstelės sienelės nebuvimas leidžia įgauti įvairias formas: ovalias,



1.5. pav.: Fitoplazmų ląstelės augalo karnienos ląstelėje. (Prof. Assunta Bertaccini, http://www.costphytoplasma.ipwgnet.org/WG1/WG1_photogallery.htm)

apvalias, pailgas, šakotas. Manoma, kad vystymosi ciklo pradžioje būna pailgų formų, o „subrendusios“ įgauna apvalias formas (Verdin et al., 2003).

Fitoplazmų genomas yra vienas iš mažiausių viduląstelių parazitų grupėje. Jo dydis, kaip ir kitų bakterijų *Mollicutes* klasėje, varijuoja nuo 530 iki 1350 kbp. Mikoplazmų genomo dydis varijuoja nuo 580 iki 1380 kbp, o

spiroplazmų nuo 780 iki 2200 kbp. Mikoplazmoms giminingoje *Acholeplasma* gentyje genomo dydis varijuoja tarp 1500 ir 1650 kbp (Marccone et al., 1999; Davis, Lee, 2000).

Šiuo metu pilnai nusekvenuoti tik keturių fitoplazmų genomai, nes yra sudėtinga gauti aukštos kokybės fitoplazmų DNR iš infekuotų augalų. Nusekvenotos buvo ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ – giminingi onion yellows mutantas (OY-M) (Oshima et al., 2004) ir aster yellows witches'-broom (AY-WB) kamienai (Bai et al., 2006), ‘*Ca. Phytoplasma australiense*’ (Tran-Nguyen et al., 2008) bei ‘*Ca. Phytoplasma mali*’ (Kube et al., 2008) genomai.

Fitoplazmų genomą sudaro viena žiedinė arba linijinė chromosoma, kurią sudaro dvigrandė DNR ir ekstrachromosominiai DNR elementai (1-4)

(plazmidės) (Marcone, 2012). Chromosomos dydis varijuoja nuo 530 iki 1350 kbp (Marcone et al., 1999), G+C santykis DNR siekia 23-29 mol% (Kollar, Seemüller, 1989; Davis, Lee, 2000).

Filogenetinė analizė parodė, jog labiausiai tikėtinas fitoplazmų protėvis yra *Acholeplasma laidlawii*. Joje, kaip ir fitoplazmose triptofaną koduojantis tripletas yra UGG, o ne UGA. Spiroplazmose bei mikoplazmose jis atlieka „stop“ kodono funkciją (Lim, Sears, 1991; Toth et al, 1994; Bertaccini, 2007).

2004 metais japonų mokslininkų grupė nusekvenavo pirmąjį fitoplazmų genomą. Tai buvo 16SrI-B pogrupio fitoplazmų (*'Candidatus Phytoplasma asteris'* OY kamienas) genomas (Oshima et al., 2004). Nustatyta, kad genomą sudaro viena 860631 bp ilgio žiedinė chromosoma ir dvi plazmidės: EcOY ir pOY, kurių ilgis – 5025 ir 3932 bp. Chromosomoje yra 754 genai, iš kurių 446 turi nustatytą funkciją. G+C kiekis chromosomoje siekia 28%, plazmidėse EcOY -25%, pOY – 24%. EcOY turi 6 genus, o pOY – 5 (Oshima et al., 2004).

Vėliau buvo nusekvenotas ir antras *'Candidatus Phytoplasma asteris'* AY-WB kamieno genomas. Šis genomas taip pat turi vieną žiedinę 706569 bp ilgio DNR chromosomą ir keturias plazmides: AY-WBpI, AY-WBpII, AY-WBpIII, AY-WBpIV. Chromosomos DNR G+C kiekis – 27%, turi 671 geną, iš kurių 450 funkcija išaiškinta. Plazmidžių DNR G+C kiekis – pI 25,6%, pII 23,9%, pIII 21,8%, pIV 25,5%, o genų skaičius – pI 5, pII 4, pIII 7, pIV 6 (Bai et al., 2006).

Palyginus abu genomus, nustatyta, jog OY kamieno chromosoma yra 154 bp ilgesnė už AY-WB kamieno. Skirtumas susidaro dėl to, kad OY kamieno chromosomoje yra daugiau pasikartojančių sekų, kurios sudaro 22,7% sekų, o AY-WB - 13,8%. Koduojančių ir nekoduojančių sekų skaičius abiejuose kamieniuose maždaug vienodas: 61,2% koduojančių ir 25% nekoduojančių sekų AY-WB kamiene, 50,3% koduojančių ir 27% nekoduojančių sekų OY kamiene (Bai et al., 2006).

'Candidatus Phytoplasma australiense' genomus sudarytas iš vienos žiedinės 879324 bp ilgio chromosomos ir vienos 3,7 kb plazmidės pCPa. Chromosomos G+C kiekis siekia 27%. Ji koduoja 839 genus, tarp kurių 502

turi nustatytą funkciją, o likę 337 nežinomos funkcijos hipotetiniai baltymai. '*Ca. Phytoplasma australiense*' chromosoma yra 18693 bp didesnė ir turi didesnę skaičių genų koduojančių žinomos funkcijos ir hipotetinius baltymus palyginus su '*Ca. Phytoplasma asteris*' OY ir AY-WB kamienais (Tran-Nguyen et al., 2008).

Linijinė '*Candidatus Phytoplasma mali*' AT kamieno chromosoma yra 601943 bp ilgio. G+C kiekis siekia 21,4% ir yra vienas iš mažiausių tarp visų žinomų mikoplazmų ir daugumos sienelę turinčių bakterijų. Plazmidžių AT kamienas neturi. Nuo '*Ca. P. asteris*' OY ir AY-WB kamienų chromosomų '*Ca. P. mali*' chromosoma skiriasi tuo, jog iš 497 nustatytų genų 68% turi nustatytas funkcijas, tuo tarpu OY (754 genai) ir WB (671 genas) kamienų funkcijos nustatytos tik 54% ir 52% genų. Mažesnis genų skaičius tai ne tik mažesnio genomo, bet ir mažesnio pseudogenų bei mažo daugiakopijinių genų skaičiaus rezultatas (89-AT, 202-AY-WB, 250-OY-M) (Kube et al., 2008)

Fitoplazmos neturi genų, koduojančių fosfotransferazinių, UDP-galaktozės metabolizmo iki gliukozės-1-fosfato bei pentozių ciklo sistemų. Iš to galima spręsti, jog fitoplazmos turi specifinę metabolinę bei medžiagų transporto sistemą (Oshima et al., 2004).

Palyginus mikoplazmų ir fitoplazmų genomus, paaiškėjo, jog fitoplazmos kaip ir mikoplazmos neturi genų koduojančių baltymus reikalingus aminorūgščių, riebiųjų rūgščių sintezei, trikarboninių rūgščių ciklui ir oksidaciniam fosforilinimui (Oshima et al., 2004).

Daugelį metabolitų jos paima iš šeimininko ląstelių citoplazmos, tuo galima paaiškinti metabolinių genų stoką. Fitoplazmos turi 27 genus koduojančius transporto sistemas, skirtas aminorūgščių, nukleorūgščių, ATP bei angliavandenių pernešimui. Viena iš jų ABC transporto sistema pernešanti maltozę, tačiau maltozę prisijungiantis baltymas giminingas ir trehaliozei (vabzdžių organizme aptinkamas angliavandenis), sacharozei bei palatinozei (Oshima et al., 2004; Bai et al., 2006).

Skirtingai nei mikoplazmos, jos turi malato transportui bei metabolizmui skirtus genus. Malatas yra pagrindinis anglies bei energijos šaltinis. Jį naudoti

labai patogiu, nes jo apstu šeimininko citoplazmoje, jo metabolizmui reikia mažiau energijos, o tai ypač svarbu, nes fitoplazmos neturi ATP sintetazių (Oshima et al., 2004; Bai et al., 2006).

Kitas fitoplazmas nuo mikoplazmų skiriantis bruožas yra sugebėjimas biosintetinti ląstelės membranai reikalingus fosfolipidus (Bai et al., 2006).

Nustatyta, jog fitoplazmos neturi *recA* geno, kurio produktas reikalingas homologinės rekombinacijos procesui. Šis genas mikoplazmose sąlygoja atsparumą šeimininko imuninei sistemai, jis lemia genų sekų pertvarką, sąlygojančių ląstelės membranos struktūrų sintezę (Bai et al., 2006).

Fitoplazmos įprastos rekombinacinės sistemos nebuvimą kompensuoja genomo plastiškumu. Jis yra sąlygotas netolygaus GC porų pasiskirstymo ir didelių mobilių pasikartojančių sekų. Šiose sekose yra daug insercinių sekų bei genų, koduojančių membranų baltymus. Mobiliųjų sekų delecijos, insercijos, replikacinės transpozicijos, padidina fitoplazmų prisitaikymo galimybes prie skirtingų šeimininkų (Bai et al., 2006).

Šios bakterijos, prisitaikiusios gyventi kaip viduląsteliniai parazitai, „atsikratė“ įvairių jų gyvenimo būdui nereikalingų funkcijų. Tokios redukcinės evoliucijos požymius galima sekti per pseudogenų (neveiklių genų) atsiradimą. Du tokius genus $\Psi folP$ ir $\Psi folK$ fitoplazmų genome atrado ir ištyrė Davis et al. (2003). Šie genai homologiški kitose bakterijose aptinkamiems *folP* ir *folK* genams, kurie koduoja dihidropteroato sintazę (DHPS) ir 6-hidroksimetil-7,8-dihidropterinpirofosfokinazę (HPPK). Abu baltymai dalyvauja folatų sintezėje. Iš to galima spręsti, kad fitoplazmos negali gaminti folatų *de novo*, todėl turi naudoti transportines sistemas jų pasisavinimui iš šeimininko. Tai gali būti vienas iš virulentiškumo veiksnių (Davis et al., 2003).

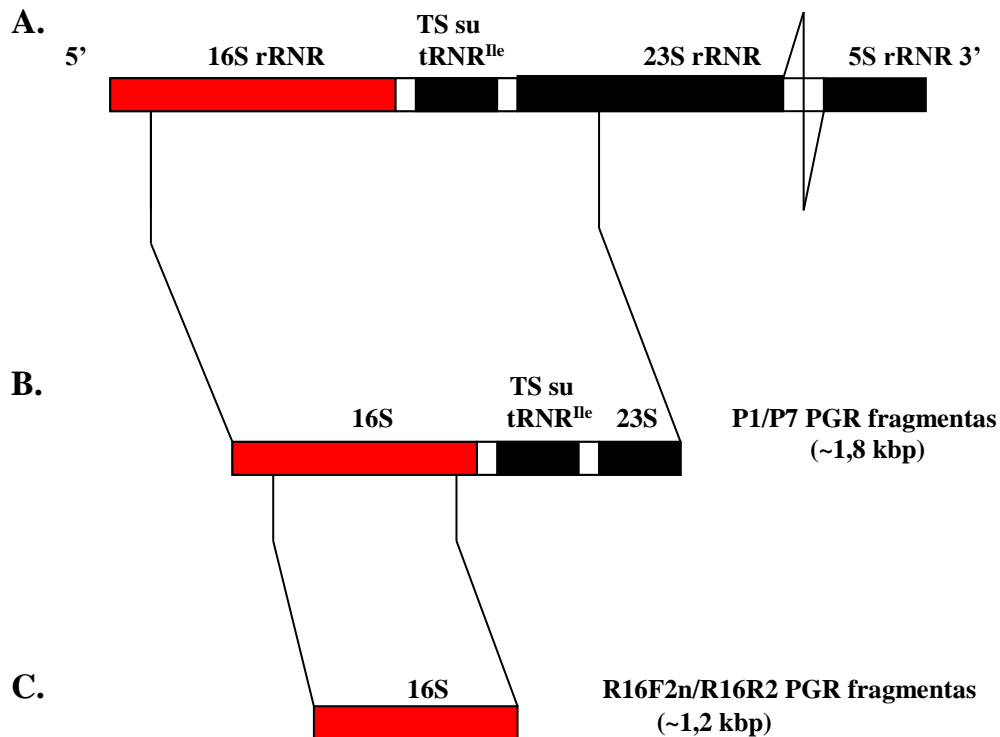
Dar viena įdomi fitoplazmų chromosomų savybė - variabilių sekų mozaikos (SVM-(angl.)sequence-variable mosaics), sudarytos iš profagų genomų liekanų. Manoma, jog kilo iš *Caudavirales* virusų (Wei et al., 2008). Šios mozaikos sudaro nemažą OY-M ir AY-WB fitoplazmų chromosomų dalį. Šie regionai sudaryti iš tvarkingai išsidėsčiusių profago genomo genų liekanų reikalingų replikacijai, rekombinacijai, pakavimui, lizei bei morfogenezei. Taip

pat šių mozaikų hipervariabiliose srityse aptinkama svetimų genų (moronų), kurie pagal kilmę nepriklauso profagui ir greičiausiai buvo atnešti iš kitų organizmų horizontalaus pernešimo būdu (Jomantiene, Davis, 2006; Jomantiene et al., 2007). SVM regionai užima nemažą chromosomos dalį (OY-M-31%; AY-WB-22,7%). Manoma, kad šie regionai gali sąlygoti dydžių, o taipogi ir savybių skirtumą tarp fitoplazminių genomų (Wei et al., 2008).

1.5. Fitoplazmų identifikavimas, *rrn* operonas ir lizdinė PGR

Fitoplazmų genomo sudėtyje yra du ribosomoniniai operonai, į kurių sudėtį įeina labai konservatyvus 16S rRNR genas bei 23S, 5S genai ir dvi tarpiklinės (angl. – spacer) sritys (1.6. pav. A.). Didžiausią išskirtinumą turi 16S rRNR nukleotidų seka, pagal kurią šiuo metu identifikuojamos fitoplazmos bei tarpiklinis regionas (maždaug 300 bp) koduojantis izoleucino tRNR ir dalį alanino tRNR sekų. Šios sekos leidžia atskirti fitoplazmas nuo kitų *Mollicutes* klasės atstovų (Kuske, Kirkpatrick, 1992; Firrao et al., 1993; Padovan et al., 1995; Marcone, Seemüller, 2001; Ho et al., 2001). Dviejų fitoplazmų kamienų rRNR genų palyginimas parodė, jog sekos koduojančios valiną ir asparaginą pernešančias tRNR išsidėsčiusios už 5S rRNR geno, o tai yra išskirtinis fitoplazmų požymis (Ho et al., 2001).

Tyrimams 16S rRNR genas pagausinamas lizdinės PGR metodu, kuris susideda iš dviejų PGR reakcijų. Pirmosios reakcijos metu padauginamas 1800 bp fragmentas, kuris susideda iš dalies 16S rRNR geno, tarpigeninio tarpiklio ir 23S geno 5' galo (1.6. pav. B.), tam naudojama universalių pradmenų pora P1/P7. Antrai reakcijai naudojami pirmos reakcijos produktai. Jos metu padauginamas pats 16S 1200 bp. dydžio rDNR fragmentas (1.6. pav. C.), tam naudojama kita pora universalių pradmenų R16F2n/R16R2 (Lee et al., 1998). Galutinio PGR produkto RFIP profiliai lyginami su klasifikacijos schemas



1.6. pav. Fitoplazmų rRNR operonas ir 16S rDNR pagausinimo (lizdinio PGR) schema, kur TS – tarpgeninė sritis. Nupiešta pagal Ho et al., 2001.

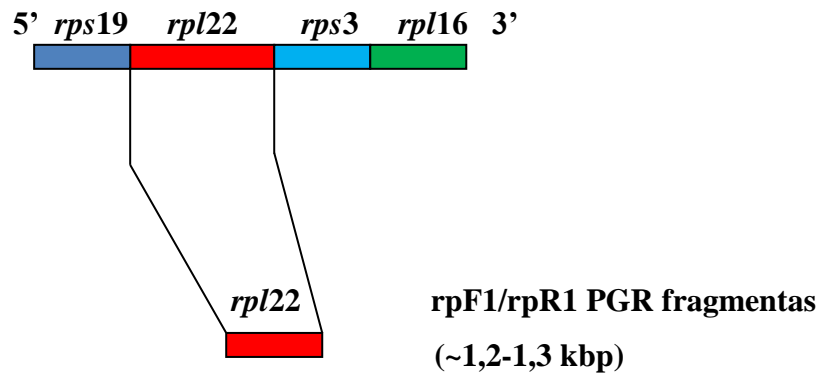
profiliais (Lee et al., 1998) (1 priedas). Taip pat 16S 1200 bp fragmentas yra klonuojamas ir nuskaitomas, o gauta seka lyginama su žinomų fitoplazmų sekomis bei atliekama jos virtuali RFIP analizė ir palyginimas su žinomų grupių fitoplazmų profiliais (Wei et al., 2007) (2 priedas).

Didelis 16S rRNR geno sekos konservatyvumas ir rRNR operonų heterogeniškumas apsunkina artimai giminingų fitoplazmų kamienų atskyrimą, todėl tikslesniam jų atskirumui naudojami papildomi filogenetiniai žymenys (*rp*, *secY*, *tuf*, 23S rRNR, 16S-23S rRNR tarpgeninės srities genų sekos) (Lee et al., 1998; Martini et al., 2007).

1.5.1. Ribosominių baltymų operonas fitoplazmų klasifikacijoje

Konservatyvios ribosominių baltymų genų sekos klasifikacijoje naudojamos dėl jų didesnio variabilumo. Dažniausiai analizuojami yra didžiojo

50S subvieneto *rpl22* (1.7. pav.) ir mažojo 30S subvieneto *rps8*, *rps3* genai (Jomantiene et al., 1998; Lee et al., 1998; Valiūnas, 2003).



1.7. pav.: Fitoplazmų ribosominių baltymų operono fragmentas ir *rpl22* geno pagausinimo schema. Nupiešta pagal Lim, Sears, 1991.

Ribosominių baltymų genų pagausinimui naudojamas taip pat lizdinės PGR metodas, tačiau naudojamos kitos pradmenų poros: rpF1/rpR1 (Lim, Sears, 1991; Lee et al., 2004; Martini et al., 2007). Gaunamas 1,2-1,3 kbp DNR fragmentas su *rpl22*. Vėliau šis DNR fragmentas naudojamas RFIP analizėje su *AluI*, *MseI* ir *Tsp509I* (Lee et al., 2004) ar *AluI*, *DraI*, *TaqI* ir *Tsp509I* (Martini et al., 2007) restrikcijos endonukleazėmis ir nuskaitomas.

1.5.2. Kitos fitoplazmų klasifikacijoje naudojamos genų sekos

tuf genas koduojantis elongacijos faktorių Tu (EF-Tu) yra pakankamai konservatyvus ir atlieka pagrindinę funkciją transliacijos procese. Jis naudojamas ne tik fitoplazmų, bet ir kitų bakterijų analizei (Schneider et al., 1997). Fitoplazmų klasifikacijoje jis naudojamas pogrupių atskyrimui 16SrI (Marcone et al., 2000) ir 16SrXII ‘*Ca. Phytoplasma australiense*’ grupėse (Streten, Gibb, 2005). 16SrI, III, X ir XII grupių fitoplazmų analizei naudojamas elongacijos faktorių G (EF-G) koduojantis *fus* genas (Berg, Seemuller, 1999). Be aukščiau paminėtų detalesnei fitoplazmų analizei bei grupių ir pogrupių atskyrimui naudojami sekrecinės sistemos *secY* (Lee et al.,

2006), *secA* (Hodgetts et al., 2008), karščio šoko *groEL* (Mitrovic et al., 2011), RNR polimerazės β -subvieneto *rpoB* (Valiunas et al., 2013) genų sekos. Taip pat šių bakterijų tyrimams bandoma pritaikyti fitoplazmų pasikartojančias konservatyvias sekas (angl. - repeated conserved sequences – RCS) (Jomantiene, Davis, 2007), imunodominantinių baltymų, antigeninių membraninių baltymų, fitoplazmų plazmidžių genus (Hodgetts, Dickinson, 2010).

1.6. Fitoplazmų taksonominė padėtis

Fitoplazmų taksonominė padėtis pagal Bergey (Garrity et al., 2001) sistemą, Gundersen et al., (1994) bei genų banko duomenų bazę (www.ncbi.nlm.nih.gov) yra tokia:

Skyrius. FIRMICUTES (GRAM+ žemo GC EUBAKTERIJOS, *Bacillus/Clostridium* grupė)

Klasė. Mollicutes (be ląstelės sienelės)

Eilė I. *Mycoplasmatales*

Šeima I. *Mycoplasmataceae*

Gentis I. *Mycoplasma*

Gentis IV. *Ureaplasma*

Eilė II. *Entomoplasmatales*

Šeima I. *Entomoplasmataceae*

Šeima II. *Spiroplasmataceae*

Gentis I. *Spiroplasma*

Eilė III. Acholeplasmatales

Šeima I. Acholeplasmataceae

Gentis I. *Acholeplasma*

Gentis II. 'Candidatus Phytoplasma'

Eilė IV. *Anaeroplasmatales*

Šeima I. *Anaeroplasmataceae*

1.7. '*Candidatus Phytoplasma*' gentis ir '*Candidatus Phytoplasma*' rūšies samprata

1995 metais *Mollicutes* taksonomijos grupė suteikė fitoplazmoms laikiną *Candidatus* statusą, kadangi jų nustatymas bei klasifikavimas atliekami tik jų gyvenamosios aplinkos, morfologijos, membranos komponentų ir nukleorūgščių, o ne biocheminių ir fiziologinių tyrimų kultūrose pagrindu. Dėl jų nekultivuojamumo dirbtinėse terpėse. '*Candidatus Phytoplasma*' genčiai priklauso organizmai: neturintys ląstelės sienelės, apsupti vien tik membrana ir jautrūs tetraciklino, bet ne penicilino poveikiui (Doi et al., 1967). Savo forma yra pleomorfiški, ląstelės apimtis svyruoja nuo 200 iki 800 nm. Tai obligatiniai parazitai, aptinkami augalų karnioje ir vabzdžių platintojų, mintančių augalų sultimis, hemolimfoje, žarnyne bei seilių liaukose (Kirkpatrick, 1991). Jų genomo dydis varijuoja nuo 530 iki 1350 kbp (Marcone et al., 1999). DNR G+C kiekis siekia 23-29% (Kollar ir Seemüller, 1989). Tarpgeninėje srityje tarp 16S ir 23S rRNR turi tRNR^{Ile} (transportinė izoleucino ribonukleorūgštis) seką (Kuske, Kirkpatrick, 1992; Smart et al., 1994; Gundersen, Lee, 1996;). UGA tarnauja kaip „stop“, o ne triptofano kodonas (Lim, Sears, 1991; Toth et al., 1994). Specifinių nukleotidinių parašų charakteristikos: A – 242 pozicijoje, T - 286 ir 1247 pozicijoje (IRPCM, 2004). 16S rRNR geno unikalaus regiono oligonukleotidinė seka yra - CAAGAYBATKATGKTKTAGCYGGDCT (IRPCM, 2004).

Atlikus žinomų fitoplazmų 16S rDNR sekų sekoskaitą ir RFIP analizę, išskirta virš 30 taksonominių grupių ir 90 pogrupių (1.1. lentelė) (Wei et al., 2007; 2011), kuriose grupių homologija siekia 97,5%. Šių grupių atstovai jau aprašomi kaip '*Candidatus Phytoplasma*' genties rūšys (IRPCM, 2004; Firrao et al., 2005). Tolesni tyrimai parodė, jog rūšys kandidatės tarpusavyje gali turėti ir didesnę nei 97,5% sekų panašumą, tačiau jų genomo, fitopatologinės ir

kitos savybės skiriasi, o tai įrodo taksonominės padėties skirtumą (Firrao et al., 2005; IRPCM, 2004).

IRPCM (International Research Projekt for Comparative Mycoplasmaology) fitoplazmų/spiroplazmų tyrimo grupė pasiūlė taisyklės naujų '*Candidatus Phytoplasma*' rūšių, kurių 16S rDNR sekų homologija didesnė nei 97,5%, aprašymui. Kamienai priklauso skirtingoms rūšims jei: 1.) platinami skirtingų vabzdžių; 2.) jų augalai-šeimininkai yra skirtingi arba jų elgesys tame pačiame šeimininke yra skirtingas; 3.) yra įrodymų apie reikšmingus skirtumus gautus DNR hibridizacijos, serologinių reakcijų ar PGR pagrindu sudarytais metodais (IRPCM, 2004; Firrao et al., 2005). Šiuo metu daugiau nei 30 '*Candidatus Phytoplasma*' rūšių jau aprašytos, o dar kelios rūšys laukia savo aprobavimo (Lee et al., 1998; Bertaccini, 2007; Wei et al., 2007, 2011; Zhao et al., 2009, 2009a; Martini et al., 2012; Davis et al., 2013; Quaglino et al., 2013).

1.1. lentelė: Fitoplazmų klasifikacija paremta *in silico* RFIP 16S rRNR genų sekų analize. Pagal Wei et al., 2007.

Fitoplazmų 16Sr grupė	Fitoplazmų kamienas	Genų banko NR.
16SrI: Aster yellows group		
I-A	Aster yellows witches'-broom phytoplasma (AYWB) <i>rrnA</i>	NC_007716
I-A	Aster yellows witches'-broom phytoplasma (AYWB) <i>rrnB</i>	NC_007716
I-B	Onion yellows phytoplasma mild strain (OY-M) <i>rrnA</i>	NC_005303
I-B	Onion yellows phytoplasma mild strain (OY-M) <i>rrnB</i>	NC_005303
I-B	'Ca. Phytoplasma asteris'	M30790
I-C	Clover phyllody phytoplasma strain CPh	AF222065
I-D	Aster yellows phytoplasma strain PaWB	AY265206
I-E	Blueberry stunt phytoplasma strain BBS3	AY265213
I-F	Aster yellows phytoplasma strain ACLR-AY	AY265211
16SrII: Peanut WB group		
II-A	Peanut witches'-broom phytoplasma	L33765
II-B	'Ca. Phytoplasma aurantifolia'	U15442
II-C	Cactus witches'-broom phytoplasma	AJ293216
II-D	'Ca. Phytoplasma australasiae'	Y10097
16SrIII: X-disease group		
III-A	Western X-disease phytoplasma	L04682
III-B	Clover yellow edge phytoplasma	AF189288
16SrIV: Coconut lethal yellows group		
IV-A	Coconut lethal yellowing phytoplasma (LYJ-C8)	AF498307
IV-B	Phytoplasma sp. LfY5(PE65)-Oaxaca	AF500334
IV-D	<i>Cartudovicia palmata</i> leaf yellowing phytoplasma	AF237615
16SrV: Elm yellows group		
V-A	'Ca. Phytoplasma ulmi'	AY197655
V-B	'Ca. Phytoplasma ziziphi' strain JWB-G1	AB052876
V-C	Alder yellows phytoplasma strain ALY882	AY197642
V-G	'Ca. Phytoplasma ziziphi'-related strain JWB-Korl	AB052879
16SrVI: Clover proliferation group		
VI-A	'Ca. Phytoplasma trifolii'	AY390261
16SrVII: Ash yellows group		
VII-A	'Ca. Phytoplasma fraxini'	AF092209
16SrVIII: Loofah witches'-broom group		
VIII-A	Loofah witches'-broom phytoplasma	AF353090
16SrIX: Pigeon pea witches'-broom group		
IX-A	Pigeon pea witches'-broom phytoplasma	AF248957
IX-D	'Ca. Phytoplasma phoenicium'	AF515636
16SrX: Apple proliferation group		
X-A	'Ca. Phytoplasma mali'	AJ542541
X-C	'Ca. Phytoplasma pyri'	AJ542543
X-D	'Ca. Phytoplasma spartii'	X92869
X-F	'Ca. Phytoplasma prunorum'	AJ542544
16SrXI: Rice yellow dwarf group		
XI-A	'Ca. Phytoplasma oryzae'	AB052873
16SrXII: Stolbur group		

Fitoplazmų 16Sr grupė	Fitoplazmų kamienas	Genų banko Nr.
XII-A	'Ca. Phytoplasma solani'	AJ964960
XII-B	'Ca. Phytoplasma australiense'	L76865
XII-C	Strawberry lethal yellows phytoplasma	AJ243045
XII-D	'Ca. Phytoplasma japonicum'	AB010425
XII-E	'Ca. Phytoplasma fragariae'	DQ086423
16SrXIII: Mexican periwinkle virescence group		
XIII-A	Mexican periwinkle virescence phytoplasma	AF248960
16SrXIV: Bermudagrass white leaf group		
XIV-A	'Ca. Phytoplasma cynodontis'	AJ550984
16SrXV: Hibiscus witches'-broom group		
XV-A	'Ca. Phytoplasma brasiliense'	AF147708
16SrXVI: Sugar cane yellow leaf syndrome group		
XVI-A	'Ca. Phytoplasma graminis'	AY725228
16SrXVII: Papaya bunchy top group		
XVII-A	'Ca. Phytoplasma caricae'	AY725234
16SrXVIII: American (TX + NE) potato purple top wilt group		
XVIII-A	'Ca. Phytoplasma americanum'	DQ174122
16SrXIX: Japanese chestnut witches'-broom group		
XIX-A	'Ca. Phytoplasma castaneae'	AB054986
16SrXX: Buckthorn witches' broom group		
XX-A	'Ca. Phytoplasma rhamni'	X76431
16SrXXI: Pine shoot proliferation group		
XXI-A	'Ca. Phytoplasma pini'	AJ632155
16SrXXII: Nigerian coconut lethal decline (LDN) group		
XXII-A	Phytoplasma sp. strain LDN	Y14175
16SrXXIII: Buckland Valley grapevine yellows group		
XXIII-A	Buckland valley grapevine yellows phytoplasma	AY083605
16SrXXIV: Sorghum bunchy shoot group		
XXIV-A	Sorghum bunchy shoot phytoplasma	AF509322
16SrXXV: Weeping tea tree witches'-broom group		
XXV-A	Weeping tea witches'-broom phytoplasma	AF521672
16SrXXVI: Mauritius sugar cane yellows D3T1 group		
XXVI-A	Sugar cane phytoplasma D3T1	AJ539179
16SrXXVII: Mauritius sugar cane yellows D3T2 group		
XXVII-A	Sugar cane phytoplasma D3T2	AJ539180
16SrXXVIII: Havana derbid phytoplasma group		
XXVIII-A	Derbid phytoplasma	AY744945

1.8. Fitoplazmos ir jų tyrimai Lietuvoje

Fitoplazmų tyrimai Lietuvoje pradėti maždaug prieš tris dešimtmečius. Tuometiniai tyrimo metodai buvo pagrįsti ultrapjūvių stebėjimais elektroniniu mikroskopu, ko neužteko tiksliai ištirti Lietuvoje paplitusių fitoplazmų įvairovės. Per šį laikotarpį buvo atlikta eilė darbų, kuriuose nustatyti MLO augalai šeimininkai bei aprašyti jų sukelti pažeidimai. MLO buvo nustatyti ir aprašyti naudinguose augaluose, tokiuose kaip: dobilai, morkos, salotos, svogūnai, bei piktžolėse: gysločiai, kiaulpienės, kreisvės, šunramunės, usnys (Staniulis, Genyte, 1974; Staniulis, Genyte, 1976; Staniulis, Sutkute, 1979; Staniulis, 1980). Taip pat buvo tiriamas tetraciklino ir temperatūros poveikis bakterijoms ir ligos eigai (Genyte, 1975; Genyte, Staniulis, 1975ab). Nustatyti vabzdžiai (*Aphrodes bicinctus*, *Philaenus spumarius*, *Macrosteles laevis*) galintys pernešti MLO ir atlikti pernešimo su jais bandymai (Genyte, 1975; Genyte, Staniulis, 1975a) Atlikti cikadelių auginimo bandymai ir jų biologijos tyrimai (Genyte, Staniulis, 1976). MLO buvo nustatyti ir jų sukeliami simptomai buvo aprašyti eilėje dekoratyvinių augalų (Makutenaite-Navalinskiene, 1981). Visi šie darbai padėjo pagrindus ir palengvino vėlesnius fitoplazmų tyrimus.

Tik atsiradus naujiems molekulinės biologijos metodams tapo įmanoma atlikti patikimą fitoplazmų identifikaciją ir klasifikaciją. R. Jomantienė ir D. Valiūnas pirmieji pradėjo tirti fitoplazmas molekuliniiais metodais, atskleidė jų įvairovę ir augalus šeimininkus Lietuvoje. Vėliau prie jų prisidėjo M. Samuitienė tirdama fitoplazmas dekoratyviniuose augaluose ir L. Urbanavičienė aptikusi šiuos mikroorganizmus grūdinėse kultūrose.

Lietuvoje aptinkamų fitoplazmų (1.2. lentelė) 16S rDNR sekų analizė RFIP metodu priskyrė jas penkioms grupėms: 16SrI, 16SrIII 16SrV, 16SrXII, ir 16SrXXI bei septyniolikai pogrupių: 16SrI-A, I-B, I-C, I-L, I-M, I-Q, I-R, I-S; 16SrIII-B, III-F, III-P, III-R, III-T; 16SrV-C, V-E; 16SrXII-E; 16SrXXI-A (Staniulis et al., 2000; Almintaite et al., 2001; Samuitienė et al., 2002; Valiūnas, 2003; Urbanavičienė et al., 2005, 2006a,b, 2007; Valiūnas et al.,

2000, 2001a, b, 2004; 2006, 2009, 2010; Jomantienė et al., 2000; 2002a, b, 2010).

1.2. lentelė. Lietuvoje aptiktos fitoplazmos.

16Sr fitoplazmų pogrups	Radavietė	Augalas šeimininkas
16SrI-A	Kauno r., Raseinių r., Vilniaus r.	Aviža, eglė, hiacintas, kermėkas, morka
16SrI-B	Aukštaitijos nacionalinis parkas, Kauno r., Varėnos r., Vilniaus r.	Baltasis dobilas, sėjamasis miežis, kriaušė, obelis
16SrI-C	Kauno r., Kėdainių r., Vilniaus r.	Ušnis, baltasis dobilas, miglė
16SrI-L	Kėdainių r., Vilniaus r.	Rapsas, kardelis
16SrI-M	Alytaus r., Kaunor., Klaipėdos r., Prienų r., Vilniaus r.	Svogūnas, valerijonas, hiacintas, usnis, ažuolas
16SrI-Q	Neringa	Vyšnia
16SrI-R	Šiaulių r.	Vyšnia
16SrI-S	Klaipėdos r.	Alyva
16SrIII-B	Ignalinos r., Kauno r.	Raudonasis dobilas
16SrIII-F	Aukštaitijos nacionalinis parkas, Rokiškio r.	Mėlynė
16SrIII-P	Kauno r.,	Kiaulpienė
16SrIII-R	Prienų r.	Ušnis
16SrIII-T	Kauno r.	Vyšnia
16SrV-C	Aukštaitijos nacionalinis parkas, Varėnos r.	Juodalksnis, baltalksnis
16SrV-E	Vilniaus r.	Avietė
16SrXII-E	Anykščių r.	Braškė

16SrXXI-A	Kauno r., Varėnos r.	Pušis
-----------	----------------------	-------

Lietuvoje aptinkamos 16SrI grupės fitoplazmos filogenetiškai labiausiai giminingos '*Candidatus Phytoplasma asteris*' rūšiai. 16SrIII grupės giminingos '*Ca. P. pruni*' rūšiai. 16SrV grupės aptikta ALY-L fitoplazma parodė didžiausią giminingumą '*Ca. P. ulmi*', kuri priklauso tai pačiai 16SrV grupei. Avietėse aptikta 16SrV-E pogrupio fitoplazma parodė didžiausią giminingumą su '*Ca. Phytoplasma rubi*' (Davis et al., 2013; Valiunas, 2007), o pušyse aptikta 16SrXXI-A pogrupio fitoplazma labiausiai gimininga '*Ca. P. pini*' rūšiai (Schneider et al., 2005).

Surinkus pakankamai duomenų, su braškių (*Fragaria x ananasa* Duschene) liga susijusiai fitoplazmai, buvo pasiūlyta suteikti '*Ca. P. fragariae*' naujos rūšies statusą (Valiunas et al., 2006).

Europoje labiausiai paplitusios fitoplazmos priklauso šešioms grupėms 16SrI, 16SrIII, 16SrV, 16SrX, 16SrXI ir 16SrXII (Lee et al., 1998; Seemüller et al., 1998).

1.9. Augalų apsauga

Fitoplazmos ekonomiškai žalingi daugelio naudingųjų augalų patogenai sukiantys žymų derliaus sumažėjimą. Norint apsisaugoti nuo fitoplazminių infekcijų imamasi įvairių priemonių. Vieni metodai paveikia naudingąjį augalą supančią aplinką, kiti veikia patį augalą.

Veikiant aplinką svarbiausias uždavinys yra sustabdyti fitoplazminės kilmės ligų plitimą (vabzdžiai platintojai) bei sunaikinti natūralius jų židinius (piktžolės). Šiam tikslui žemės ūkyje dažniausiai naudojami pesticidai bei agrariniai metodai (McCoy, Williams 1982; Staniulis, 1988). Nemažiau svarbu žinoti, kurį aplinkos elementą paveikti, kad rezultatas būtų optimaliausias. Pilkington et al. (2004) pastebėjo, kad apdorojus sisteminius insekticidais tik

lauko pakraščius, vabzdžių platintojų populiacijos ir ligų protrūkiams žymiai sumažėjo. Mori et al. (2008) nustatė atvirkščią reiškinį, kai insekticidų naudojimas visame vynuogių lauke ženkliai nesumažino *Hyalesthes obsoletus* Signoret vabzdžių rūšies populiacijos. Manoma, tokie rezultatai gauti, nes vynuogės nėra *H. obsoletus* „mėgstami“ augalai – ant jų maitinasi tik atsitiktinai (Weintraub, Willson, 2010). Šie duomenys parodo, kad svarbu yra kontroliuoti ir piktžolių – natūralių infekcijos šaltinių paplitimą. Tyrimais įrodyta, kad tam tikros laukinių augalų rūšys (*Cirsium arvensis*, *Urtica dioica*) sukuria palankesnes sąlygas ligos plitimui (Bressan et al., 2007; Maixner, 2007), o tinkamu laiku atliktas piktžolių sunaikinimas, efektyviai sumažina vabzdžių platintojų populiacijas (Stark-Urnau, Kast, 2008).

Siekiant apsaugoti naudinguosius augalus sukuriama įvairūs barjerai. Augalai apsupami kitais augalais, kurie atbaido arba pritraukia vabzdžius nuo jų (Arocha et al., 2009; Zahavi et al., 2007). Apsaugai naudojami dirbtiniai ir natūralūs mulčiai, kurie atbaido arba paveikia platintojų vystymosi ciklą (Summers, Stapleton, 2002; Weintraub, Willson, 2010). Vienas iš efektyviausių apsaugos būdų yra tinklelių nuo vabzdžių naudojimas (insect-exclusion screening - angl.). Šią priemonę galima panaudoti tik tam tikrų kultūrų, pavyzdžiui, papajų (Elder et al., 2002), vynuogių (Mannini, 2007), švelnaus klimato regionuose apsaugai (Weintraub, Willson, 2010). Barjerinėms priemonėms priskiriami taip pat neorganinių (mineralinių) medžiagų purškiami preparatai, kurie sukuria ant augalo mineralines plėveles. Dažniausiai naudojami yra kaolino (aliuminio silikatas) milteliai (Weintraub, Willson, 2010). Jie veikia dvejopai: užblokuoja vabzdžio pernešėjo kvėpavimo takus arba kliudo jam maitintis ir dėti kiaušinėlius ant augalo (Puterka et al., 2003). Kaolinas yra lengvai nuplanamas vandeniu, todėl dažni lietūs ir paviršinio laistymo sistemos labai sumažina jo efektyvumą (Weintraub, Willson, 2010).

Viena iš ekologiškiausių priemonių kovai su fitoplazmų pernešėjais yra jų gamtinių priešų: vorai (*Araneae*), žolblakės (*Miridae*), bei parazitoidų: vyčių (*Dryinidae*, *Mymaridae*), pipunkulidų (*Diptera*) panaudojimas (Weintraub, Willson, 2010). Taip pat bandoma sukurti sistemas, kuriose būtų panaudojami

vabzdžių platintojų simbiotiniai mikroorganizmai. Šiuos mikroorganizmus norima pakeisti taip, kad jie vienu ar kitu būdu sukliudytų pernešti fitoplazmas (Alma et al., 2010).

Efektyviausi būdai sumažinti fitoplazmų sukeltus žemės ūkio nuostolius yra: atsparių rūšių sukūrimas, augalo natūralių gynybos sistemų aktyvavimas ir pačio augalo genetinių savybių pakeitimas. Rezistentinės rūšys sukuriamos augalų selekcijos metodais ir pasižymi atsparumu fitoplazmoms arba savybėmis trukdančiomis maitintis vabzdžiams platintojams (Weintraub, Willson, 2010). Išsiaiškinta, kad kai kurios vynuogių veislės patiria visišką fitoplazminių simptomų remisiją (Osler et al., 2003; Maixner, 2006). Taip pat pastebėta, kad augalai įgyja sisteminį atsparumą (systemic acquired resistance – angl.) paveikti nariuotakojų ar kitų patogenų (Sticher et al., 1997). Remiantis šiais duomenimis, vykdomi tyrimai siekiant dirbtinai aktyvinti augalo gynybinius atsakus. Atsakas susidaro sukeliant augalams stresą, naudojant agrotechninius metodus (genėjimas, augalo išrovimas, dalinis išrovimas) (Romanazzi, Murolo, 2008) arba chemines medžiagas (benzotiadiazolas, auksinas, chitozanas, oligosacharidai) (Sticher et al., 1997; Curkovic Perica, 2008; Weintraub, Willson, 2010).

Kitas metodas yra genetiškai modifikuoti augalus, įterpiančią juos genus, kurių produktai stabdytų fitoplazmų augimą bei metabolizmą (Bove, Garnier, 2002; Weintraub, Willson, 2010). Tuo tikslu bandoma modifikuoti augaluose gaminamus lektinus (baltymai surišantys angliavandenius) taip, kad jie sutrikdytų vabzdžių pernešėjų mitybą arba būtų toksiški jiems (Saha et al., 2006; Weintraub, 2007).

Jau infekuotus augalus galima gydyti naudojant termoterapiją ir krioterapiją, o ypač vertingas augalų rūšis galima atkurti iš apikalinių meristemų (Bove, Garnier, 2002; Wang, Valkonen, 2008). Augalų gydymui taip pat naudojami antibiotikai (tetraciklinas) (Davis et al., 1968). Nors tai efektyvi, tačiau trumpalaikė bei brangi priemonė (McCoy, 1982; Kaminska, Silwa, 2003). Efektyviausiu būdu kontroliuoti ligos plitimą, infekcijai patekus į

naudinguosius augalus (ypač daugiamečius), išlieka sergančių augalų naikinimas (Weintraub, Willson, 2010).

Dar neinfekuotų tam tikromis fitoplazmomis teritorijų apsaugojimui svarbu griežtai laikytis karantino taisyklių (Davis, Lee, 2000; Bertaccini, 2007). Viena iš karantino priemonių yra vynmedžių sodinukų apdorojimas karščiu - taip sunaikinami pernešėjų kiaušinėliai bei fitoplazmos (Caudwell, 1966; Mannini, 2007).

2. TYRIMŲ MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos

Genominės DNR išvalymo rinkinys (Genomic DNA Purification Kit) (MBI Fermentas).

Klonavimo rinkinys (InsTAclone™ PCR Cloning Kit) (MBI Fermentas).

Plazmidžių išskyrimo rinkinys (GeneJET Plasmid Miniprep Kit) (MBI Fermentas).

Agarozė (TopVision Agarose) (MBI Fermentas).

Bisakrilamidas (ROTH).

Etanolis (UAB Stumbras).

Trichlorometanas (ROTH).

TEMED (Sigma-Aldrich).

Amonio persulfatas 98% (Sigma-Aldrich).

Skystas azotas (UAB Elme Messer Lit).

DNR polimerazės:

Taq DNA Polymerase (MBI Fermentas).

AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase with Buffer (Lifetechnologies).

10x TA (Tris acetatinis) buferis: Tris bazė - 48,66g, EDTA (etilendiaminotetraacto rūgštis) – 7,44g, ledinė acto rūgštis – apie 15ml, iki pH 8, dist. vanduo – iki 1 litro.

10x TBE (Tris-borato-EDTA) buferis: Tris bazė – 108g, boro rūgštis – 55g, 0,5M EDTA pH8 – 40ml, dist. vanduo - iki 1 litro.

LB terpė (skysta arba agarizuota):

Bakto-triptonas 10g, Bakto-mielų ekstraktas 5g, NaCl 10g, distiluotas vanduo – iki 1 litro. Standinimui pridėti 15g agar-agaro.

Restrikcijos buferiai:

Paimti iš atitinkamos restrikcijos endonukleazės rinkinio (MBI Fermentas)

Buferis 1 – 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA (jaučio serumo albuminas);

Buferis 2 – 10mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,1 mg/ml BSA;

Buferis 3 – 33mM Tris-acetatas (pH 7,9), 10 mM Mg-acetatas, 66 mM K-acetatas, 0,1 mg/ml BSA (MBI Fermentas).

Restrikcijos endonukleazės 10 U/μl: *AluI*, *BfaI*, *MseI*, *KpnI*, *HhaI*, *HaeIII*, *HpaII*, *RsaI*, *HinfI*, *TagI* (MBI Fermentas).

Etidžio bromidas: koncentruotas tirpalas – 10 mg/ml; darbinis tirpalas- 0,5-1 μg /ml.

Dažai:

Etidžio bromidas (Boehringer Mannheim GmbH)

Agaroziniam geliui: 6 x Loading Dye – 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% bromfenolio mėlis, 60% glicerolis, 60 mM EDTA (MBI Fermentas).

Bisakrilamidiniam geliui: 6 x Loading Dye (MBI Fermentas).

DNR dydžio žymenys:

GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (MBI Fermentas).

phiX174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) (MBI Fermentas).

2.2 Vabzdžių pavyzdžių rinkimas ir paruošimas

Vabzdžių pavyzdžiai nuo žolinių augalų buvo pagauti naudojant entomologinį graibštą. Nuo sumedėjusių augalų vabzdžiai buvo renkami

naudojant muštuką ir padėklą. Sugauti vabzdžiai buvo atrinkti naudojant ekshausterį ir numarinti etanolio tirpale. Tolimesniems tyrimams bei saugojimui vabzdžiai buvo sugrupuoti pagal morfologinius požymius ir perkelti į ependorfinius mėgintuvėlius su 90% etonalio tirpalu.

2.3. Vabzdžių identifikavimas ir klasifikacija

Cikadelių pavyzdžiai, naudojami Europoje paplitusių *Hemiptera* būrio vabzdžių apibūdintojus (Ossiannilsson, 1978; 1981; 1983), buvo identifikuoti ir klasifikuoti pagal morfologinius kūno dalių ir lytinių organų požymius, stebint juos pro binokuliarą. Sunkiai apibūdinami vabzdžiai buvo nusiųsti entomologui dr. G. Söderman į Suomijos aplinkotyros institutą (Finnish Environment Institute, Helsinki, Finland). Vabzdžių nuotraukos gautos naudojant gamtos tyrimų centro laisvosios prieigos centro binokuliarą (Nikon SMZ 800) su įmontuota kamera (Nikon DS-Fi1) ir fotovaizdinimo įrangą.

2.4. Tyrimams pasirinkti vabzdžiai

Anaceratagallia ribauti (Ossiannilsson 1938)

Auchenorrhyncha pobūrio *Cicadellidae* šeimos *Agallinae* pošeimiui priklausanti rūšis (2.1. pav.) plačiai paplitusi Europoje ypač vakarų



2.1. pav.: *Anaceratagallia ribauti*.

palearktiniame regione, aptinkama sausose pievose, kopose, saulėtose

pakrančių atodangose. Žiemoja suaugėlės patelės. Per metus išsivysto viena karta. Suaugėliai aptinkami kovo – balandžio ir liepos – spalio mėnesiais; aptinkamos ant *Plantago* genties ir *Fabaceae*, *Lamiaceae* šeimos augalų (Ossiannilsson, 1981; Nickel, Remane, 2002).

***Aphrodes* sp. Curtis 1829**

Auchenorrhyncha pobūrio *Cicadellidae* šeimos *Aphrodinae* pošeimiui priklausanti gentis (2.2. pav.). Danijoje ir Fennoskandijos regione aptinkamos



2.2. pav.: *Aphrodes* sp..

dvi šios genties rūšys *A. makrovi* Zachvatkin 1948 ir *A. bicincta* (Schrank, 1776). Abi aptiktos taip pat ir Lietuvoje (Söderman et al., 2009). Šios rūšys morfologiškai labai panašios, todėl dažnai yra painiojamos. *A. makrovi* plačiai paplitusi palearktiniame ir nearktiniame regionuose. Aptinkama pievose, lankose, dirbamuose laukuose. Žiemoja kiaušinio stadijoje. Per metus išsivysto viena karta. Suaugėliai aptinkami gegužės – spalio mėnesiais. Polifagai – dažnai aptinkami ant *Urtica dioica*, *Taraxacum* sp. ir kitų augalų. *A. bicincta* rečiau Europoje aptinkama rūšis. Pagrindinės jų buveinės sausos ir šlapios pievos, laukai. Suaugėliai pasirodo liepą – rugsėjį. Oligofagai – dažniausiai maitinasi ant *Fabaceae* šeimos augalų. Per metus subręsta viena karta. Žiemoja kiaušinio stadijoje (Ossiannilsson, 1981; Nickel, Remane, 2002; Söderman et al., 2009).

***Aphrophora alni* Fallen 1805**

Auchenorrhyncha pobūrio *Aphrophoridae* šeimai priklausanti rūšis (2.3. pav.) gausiai paplitusi visoje Europoje, Alžyre, Maroke, šiaurės, centrinėje ir



2.3. pav.: *Aphrophora alni*.

rytų Azijoje. Suaugėliai aptinkami birželio-rugsėjo mėnesiais. Per metus subręsta viena karta. Žiemoja kiaušinėliai. Nimfos dažniausiai aptinkamos dideliuose putų gumuluose ant dviskilčių augalų stiebų pamatinių dalių. Polifagai – suaugėliai gali maitintis ant sumedėjusių augalų (*Betula pubescens*, *Alnus glutinosa*, *Salix* sp.), nimfos aptinkamos tik ant žolinių (Ossiannilsson, 1981; Nickel, Remane, 2002).

***Arthaldeus striifrons* (Kirschbaum 1868)**

Auchenorrhyncha pobūrio *Cicadellidae* šeimos *Deltocephalinae*



2.4. pav.: *Arthaldeus striifrons*.

pošėimiui priklausanti rūšis (2.4. pav.) paplitusi visoje Europoje – ypač Viduržemio regione, retai aptinkama šiaurės ir rytų Europoje. Randama drėgnose ir pajūrio pievose bei lankose. Monofagai – dažniausiai maitinasi ant *Festuca* genties augalų. Per metus išsivysto 1-2 kartos. Suaugėliai aptinkami liepos – rugpjūčio mėnesį (Ossiannilsson, 1983; Nickel, Remane, 2002).

***Cacopsylla mali* (Schmidberger 1836)**

Sternorrhyncha pobūrio *Psyllidae* šeimai priklausanti rūšis (2.5. pav.) paplitusi visame palearktiniame regione, dažnai aptinkama pietų ir centrinėje



2.5. pav.: *Cacopsylla mali*.

Rytų Fennoskandijos dalyje, introdukuota Šiaurės Amerikoje, Australijoje. Žiemoja kiaušinėlių stadijoje. Kiaušinėliai dedami rugpjūčio-rugsėjo mėnesiais ant žiemojančių pumpurų, jaunų ūglių ir šakelių. Per metus išsivysto viena karta. Nimfos pradeda risti balandžio-gegužės mėnesį. Suaugėliai aptinkami birželio ir spalio mėnesį. Oligofagai – dažniausiai maitinasi ant *Malus* genties augalų, taip pat aptinkami ant *Pyrus* genties augalų. Žinomi kaip sodų kenkėjai (Ossiannilsson, 1992).

***Cicadella viridis* (Linnaeus 1758)**

Auchenorrhyncha pobūrio *Cicadellidae* šeimos *Cicadellinae* pošeimiui priklausanti rūšis (2.6. pav.) paplitusi Europoje bei paleartinėje Azijos dalyje.



2.6. pav.: *Cicadella viridis*.

Aptinkama pievose, lankose, pelkėse, miškuose. Žiemoja kiaušinėlio stadijoje. Kiaušinėlius deda bei dažnai aptinkama ant *Juncus*, *Carex*, *Scirpus* genties augalų. Per metus išsivysto 1-2 kartos. Polifagai – besimaitinantis ant 166 augalų rūšių iš 39 šeimų. Žinoma, kaip vaismedžių, vynmedžių, javų, cukrinių

runkelių, kopūstų ir *Alnus*, *Betula*, *Salix* kenkėjas. Augalus pažeidžia patelės kiaušinėlių dėjimo metu (Ossiannilsson, 1983; Nickel, Remane, 2002).

***Euscelis incisus* (Kirschbaum 1858)**

Auchenorrhyncha pobūrio *Cicadellidae* šeimos *Deltocephalinae* pošeimiui priklausanti rūšis (2.7. pav.) paplitusi visame palearktiniame regione, išskyrus jo šiaurines dalis. Aptinkama įvairaus tipo pievose, kopose. Per metus subręsta 1-2 kartos. Žiemoja kiaušinėlio arba nimfos stadijoje. Suaugėliai pasirodo balandžio –



2.7. pav.: *Euscelis incisus*.

gegužės ir birželio – rugsėjo mėnesiais. Oligofagai – maitinasi ant *Fabaceae* ir *Poaceae* šeimos augalų (Ossiannilsson, 1983; Nickel, Remane, 2002).

***Lepyronia coleoptrata* (Linnaeus 1758)**

Auchenorrhyncha pobūrio *Aphrophoridae* šeimai priklausanti rūšis (2.8. pav.). Aptinkama visame palearktiniame regione. Polifagai – dažniausiai



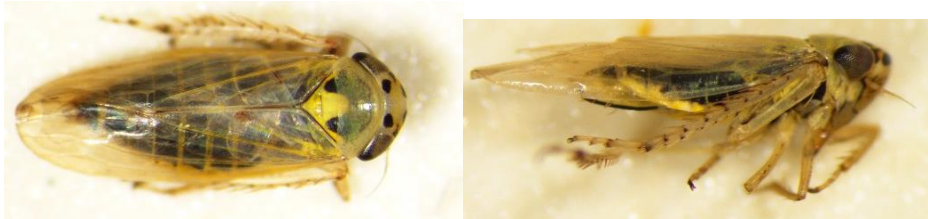
2.8. pav.: *Lepyronia coleoptrata*.

aptinkami ant *Poaceae* ir dviskilčių augalų. Taip pat minta ir ant sumedėjusių augalų (*Salix*, *Populus*, *Betula*, *Corylus*), todėl šią rūšį galima rasti ne tik pievose, bet krūmynuose ir miškuose. Žiemoja kiaušinėliai. Per metus išsivysto

viena karta. Suaugėliai pasirodo birželį – rugsėjį (Ossiannilsson, 1981; Nickel, Remane, 2002).

***Macrosteles sexnotatus* (Fallen 1806)**

Auchenorrhyncha pobūrio *Cicadellidae* šeimos *Deltocephalinae* pošeimiui priklausanti rūšis (2.9. pav.) paplitusi visame palearktiniame



2.9. pav.: *Macrosteles sexnotatus*.

regione. Randama įvairaus tipo pievose, dobilų laukuose, ganyklose, paežerių ir pajūrio pievose, pelkynuose. Per metus išsivysto dvi kartos. Žiemoja kiaušinėlio stadijoje. Suaugėliai aptinkami birželį – rugsėjį. Polifagai – dažnai aptinkami ant *Poaceae*, *Juncaceae*, *Cyperaceae* šeimos augalų (Ossiannilsson, 1983; Nickel, Remane, 2002).

***Philaenus spumarius* (Linnaeus 1758)**

Auchenorrhyncha pobūrio *Aphrophoridae* šeimai priklausanti rūšis (2.10. pav.) dažna visame palearktiniame regione. Aptinkama pievose, dirbamuose



2.10. pav.: *Philaenus spumarius*.

laukuose, krūmynuose, miškuose. Per metus išsivysto viena karta. Žiemoja kiaušinėliuose. Nimfos apsisaugojimui apsigaubia putu gumulais. Suaugėliai randami birželio – spalio mėnesiais. Polifagai – dažniausiai minta ant

dviskilčių žolinių augalų, tačiau gali misti ir ant sumedėjusių augalų jaunų ūglių. Suaugę individai gali skraidyti, bet tik trumpus atstumus. Migracijos kryptis priklauso nuo vyraujančio vėjo krypties (Ossiannilsson, 1981; Nickel, Remane, 2002).

***Stenocranus minutus* (Fabricius 1787)**

Fulgoromorpha pobūrio *Delphacidae* šeimos *Stenocraninae* pošeimiui priklausanti rūšis (2.11. pav.) dažna vakarų palearktikos regione. Aptinkama



2.11. pav.: *Stenocranus minutus*.

pievose, kopose, smėlėtose lygumose pelkėse ir miškuose. Žiemoja suaugėliai. Per metus subręsta viena karta. Suaugėliai aptinkami rugsėjį-birželį. Monofagai – minta ant *Dactylis* genties augalų – dažniausiai ant *Dactylis glomerata*, *D. polygama* (Ossiannilsson, 1978; Nickel, Remane, 2002).

2.5. Fitoplazmų pernešimo vabzdžiais bandymai

Pernešimo bandymams atlikti atskiroje šiltnamio sekcijoje iš sėklų buvo išaugintos sveikų augalų baltųjų dobilų (*Trifolium repens* L.); žiemių (*Catharanthus roseus* (L.) G.Don) ir branto (*Cuscuta* sp.) sodinukai. Cikadelės (*Euscelis incisus* (Kirschbaum 1858) kolonijos įveisimui buvo surinktos iš pievų, kuriose nebuvo aptikta fitoplazmomis užkrėstų augalų. Vabzdžiai buvo patalpinti į tinkleliu uždengtus insektariumus su baltaisiais dobilais. Vėliau jie bei augalai, kuriais jie mito buvo patikrinti, siekiant nustatyti fitoplazmines infekcijas. Rezultatai parodė, jog augalai bei cikadelės neužkrėsti fitoplazmomis.

Infekuoti dobilų filodijos (CPh) fitoplazma baltieji dobilai buvo surinkti iš laukų (Kauno raj.), kur anksčiau buvo aptiktos šios fitoplazmos. Infekuoti augalai buvo panaudoti CPh fitoplazmos perkėlimui branto pagalba į sveikas žiemes, kurios vėliau buvo panaudotos šios fitoplazmos perkėlimui į sveikus baltųjų dobilų daigus. Šie savo ruožtu buvo panaudoti cikadelėms užkrėsti. Visi augalai prieš ir po CPh fitoplazmos perkėlimo bandymų nuo dobilo dobilui buvo tikrinami dėl fitoplazminio užkrėtimo.

Perkėlimo cikadelėmis bandymui buvo atlikti šiltnamyje bei spintoje su reguliuojamu apšvietimo režimu. Vabzdžių kontrolei buvo panaudoti geltonieji, lipnieji lapai-gaudyklės. Dirbtinai veisiamų, sveikų *E. incisus* 3-4 stadijos nimfų 20-30 individų grupės buvo patalpintos į insektariumus su CPh fitoplazma užkrėstais dobilais 14 dienų „įgijimo“ laikotarpiui. Išgyvenę individai (20-25-23 – min-max-vidurkis) buvo surinkti bei perkelti į insektariumus su sveikais dobilais 2-3 savaitėms inokuliacinio maitinimosi laikotarpiui. Kontrolei buvo panaudoti sveiki baltųjų dobilų daigai, patalpinti į insektariumus be cikadelių. Po inokuliacinio laikotarpio augalų bei vabzdžių pavyzdžiai buvo surinkti fitoplazmų aptikimui bei identifikacijai, o augalai nupurkšti insekticidu. Per visą bandymų laikotarpį augalai buvo laikomi uždaruose insektariumuose. Po 2-3 savaičių inokuliacinio laikotarpio augalai buvo pakartotinai patikrinti dėl fitoplazminio užkrėtimo.

2.6. Simptomatiniai augalai

Pavyzdžiai buvo surinkti įvairiose Lietuvos vietovėse nuo augalų su būdingais fitoplazmoms simptomais (2.2. lentelė): pageltimas, filodija, žiedlapių pažaliavimas, žemaūgė, krūmijimas, raganų šluotos, augalo apmirimas ir kt. Mėginiai buvo dedami į polietileningus maišelius su sudrėkintų filtriniu popieriumi ir užregistruojami. Laboratorijoje pavyzdžiai buvo susmulkinti, išpjauštos gyslos ir sudėti į mažesnius maišelius su detalesniais aprašymais (mėginio numeris, surinkimo data, rūšis, vietovė, simptomai) bei užšaldyti -20°C temperatūroje.

2.7. Augalų ir vabzdžių DNR išskyrimas

Skyrimas atliekamas naudojant Genominės DNR išvalymo rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas su modifikacijomis – ilgesni centrifugavimo intervalai: 1.) +0,5min.; 2.) +8 min.; 3.) +6-7 min.

Skiriamojame DNR yra augalo/vabzdžio DNR kartu su santykinai maža koncentracija fitoplazmų DNR. Pasirinktą mėginį sutriname grūstuvėlyje naudojant skystą azotą. Nedidelį kiekį mėginio (apie 25-30 mg) suberiame į Eppendorfo mėgintuvėlį ir užpilame 200 µl dejonizuoto vandens. Po to įpilame 400 µl lizės tirpalo ir inkubuojame mėgintuvėlius 10 min 65 °C vandens vonioje. Išėmus iš vonios, įpilame į mėgintuvėlius 600 µl chloroformo. Pamaišome mėgintuvėlio turinį apverčiant 3-5 kartus ir centrifuguojame Eppendorfo mikrocentrifugoje 2,5 min 16000 aps./min. 80 µl precipitacijos tirpalo (DNR nusodinimui) įpilame į naują Eppendorfo mėgintuvėlį ir pridedame 720 µl dejonizuoto vandens. Į paruoštą tirpalą supilame viršutinę vandeningąją (angl. - aqueous) nucentrifuguoto tirpalo fazę. Pamaišome 1 min ir centrifuguojame 10 min 16000 aps./min. Po centrifugavimo, atsargiai nupilame skystį. Likusią ant dugno DNR ištirpiname 100 µl NaCl (1,2 M) tirpalo, įsitikiname, kad ištirpo. Po to įpilame 300 µl 95% (šalto) etilo alkoholio, kad vėl nusodintume DNR ir pamaišome. Tirpalą laikome 1-20 val. -20 °C temperatūroje. Po to tirpalą vėl centrifuguojame 6 min 13000 aps./min. Etilo alkoholių išpilame ir vėl įpilame 70% etilo alkoholio. Centrifuguojame 10 min 16000 aps./min, išpilame etilo alkoholių ir palaikome pravirus mėgintuvėlius, kad galutinai išgaruotų alkoholis. Vėliau DNR ištirpiname 80 µl dej. vandens. Vandenyje ištirpintą DNR galima saugoti ilgesnį laiką 4 °C temperatūroje.

2.8. Lizdinė PGR

Paruošiamo PGR reakcijos mišinį dviem reakcijoms. Į Eppendorfo mėgintuvėlį įpilame 59,5 µl dejonizuoto vandens, 16 µl 25 mM MgCl₂, 10 µl 10 x PGR buferio, 8 µl 2,5 mM dNTP mišinio, 2 µl 20 pM/ universalus P1A (5'-AACGCTGGCGGCGGCCTAATAC-3') pradmens ir 2 µl 20 pM universalus 16S-Sr (5'-GGTCTGTCAAACTGAAGATG-3') pradmens, viską pamaišome ir įpilame 0,5 µl 5 U/µl *Taq* DNR polimerazės, viską vėl pamaišome ir trumpai centrifuguojame (keletą sekundžių). Į kontrolinį mėgintuvėlį įpilame 48,5 µl reakcijos mišinio ir 1,5 µl dejonizuoto vandens. Į reakcinį mėgintuvėlį įpilame taip pat 48,5 µl reakcijos mišinio ir 1,5 µl bendros DNR tirpalo. Vėl trumpai centrifuguojame ir vykdome PGR reakciją naudojant Eppendorf termociklerį. Reakcijos sąlygos: 1.) 94 °C 2 min; 2.) 94 °C 1 min; 3.) 55 °C 2 min; 4.) 72 °C 3 min; 5.) 2-4 etapai kartojami 35 kartus; 6.) 72 °C 20 min. Užbaigus pagrindinę reakciją, reakcijos mišinys atšaldomas iki 4 °C. Šios PGR reakcijos metu padauginome 1,8 kb ilgio fragmentą, kuriame yra 16S rRNR geno sekos, tarpgeninis tarpiklis ir 23S rRNR 5' galas.

Antrajai PGR reakcijai paruošiamo tokį patį reakcijos mišinį, tik įdedame kitą pradmenų porą po 20 pM/µl – R16F2n/R16R2n (5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'/5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAAC-3'), amplifikuojančią 16S rDNR sekas. Mišinius kontrolei ir reakcijai supilstome taip pat, kaip ir pirmajai reakcijai, tik vietoj bendros DNR tirpalo pilame 1,5 µl pirmoje reakcijoje gauto PGR produkto, praskiesto santykiu 1:50. Antroji PGR reakcija vykdoma tokiomis pačiomis sąlygomis, kaip ir pirmoji reakcija.

2.9. PGR produktų RFIP analizė

Restrikcijos mišinius paruošiamo naudodami šias restrikcijos endonukleazes: *AluI*, *BfaI*, *MseI*, *KpnI*, *HhaI*, *HaeIII*, *HpaII*, *RsaI*, *HinfI*, *TaqI*.

Į Eppendorfo mėgintuvėlius įpilame po 13 μl dejonizuoto vandens, po 4 μl PGR produkto, po 2 μl endonukleazei specifinio buferio, pateikto restrikcijos endonukleazės rinkinyje, ir po 1 μl kiekvienos restrikcijos endonukleazės. Trumpai nucentrifuguojame (keletą sekundžių) ir inkubuojame termostate 37 °C temperatūroje 4-12 val.

2.10. DNR elektroforezė

PGR produktų elektroforezė 1% agaroziniame gelyje

DNR elektroforezė atliekama 1% agaroziniame gelyje 1 x TA buferiniame tirpale 1 val., naudojant horizontalias agarozės plokšteles, esant 80-90 V įtampai. Pagausintų PGR produktų dydžio nustatymui naudojamas DNR dydžio markeris - GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, kurio fragmentų dydžiai yra: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp. Po elektroforetinio frakcionavimo gelis dažomas etidžio bromido tirpale (20 min.) (1μg/ml) bei atplaunamas nuo nesurišto dažo vandenyje (10 min.). Išsiskirsčiusi DNR buvo stebima UV šviesoje transiliumatoriumi. Gautas gelio vaizdas fiksuojamas Bio-Rad GelDoc XR gelių dokumentavimo sistema.

Restrikcijos fragmentų vertikalioji elektroforezė 5% bisakrilamidiniame gelyje

Vertikalioji elektroforezė 5% bisakrilamidiniame gelyje vykdoma po restrikcijos mišinių inkubacijos. 5% bisakrilamidinio gelio sudėtis: 18 ml dist. vandens, 2,5 ml 10 x TBE buferio, 4,5 ml 40% bisakrilamido, 310 μl 10% amonio persulfato, 15,6 μl 99% TEMED. Kambario temperatūroje gelis polimerizuojasi maždaug 45 min. Po to gelį įstatome vertikaliai į elektroforezės prietaisą ir įpilame 1 x TBE buferio.

Prieš elektroforezę į restrikcijos mišinių mėgintuvėlius įpilame 3,3 μl dažo (6 x Loading Dye, MBI Fermentas). Į kraštinius šulinėlius įpilame

markerio, phiX174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*), restrikcijos fragmentų ilgio nustatymui, kurio fragmentų dydžiai yra: 1353, 1078, 872, 692, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp. Elektroforezė vykdoma 1 val, naudojant 160 V (150-180V) įtampą. Po elektroforezės gelis dažomas 20 min etidžio bromido tirpale. Po to praplaunamas distiliuotu vandeniu 10 min.. DNR stebima UV šviesoje fotovaizdinimo kameroje (Bio-Rad Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System). Gelio vaizdas fiksuojamas Bio-Rad GelDoc XR gelių dokumentavimo sistema (Image Lab™).

2.11. PGR pagausintų genų klonavimas

PGR pagausinti 16S rRNR, *rpl22/rps3*, *secY* genai buvo klonuoti į pUC57 klonavimo vektorių, naudojant Inst/Aclone™ PCR Product Cloning Kit klonavimo rinkinį. Klonavimas buvo atliktas pagal gamintojų nurodymus. Rekombinantiniai klonai buvo atrinkti pagal β -galaktozidazės α -komplementacijos testą. Klonai buvo atrinkti pagal *AluI*, *MseI*, *HhaI*, *HpaII*, *Hinfl*, *RsaI*, *BfaI* restrikcijos profilius.

2.12. rDNR nukleotidinės sekos nuskaitymas (sekoskaita)

Fitoplazmų rDNR nukleotidinės sekos nustatymui buvo padaugintos ir išvalytos rekombinantinės plazmidės, o taip pat paruošti atitinkami, sekoskaitai skirti pradmenys. Plazmidės išskirtos naudojant GeneJET Plasmid Miniprep Kit (MBI Fermentas) plazmidžių skyrimo rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas. DNR sekoskaita buvo atliktas automatiniu metodu Biotechnologijos instituto ir „MacroGen“ sekoskaitos centruose.

Sekvenavimui naudoti šie pradmenys:

16S rDNR F2n/R2n; *rpl22* F1A/R1A; *secY* F1/R1 PGR produktams sekvenuoti;

F2n 5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'

R2n 5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAAC-3'

F1A 5'-TTTTCCCCTACACGTACTTA-3'

R1A 5'-GTTCTTTTTGGCATTAAACAT-3'

F1 5'-GGACATAAGTTAGGTGAATTT-3'

R1 5'-ACGATATTTAGTTCTTTTTGG-3'

Sekoskaitai nuo plazmidinio vektoriaus pUC57 naudoti M13F, M13R.

M13F 5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'

M13R 5'-CGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA-3'

2.13. Nukleotidinių sekų kompiuterinis apdorojimas ir analizė

Visi darbai atlikti remiantis Lee et al. (1998), Zhao et al. (2009) straipsniais bei kompiuterinių programų naudojimo vadovų aprašymais.

Nuskaitytos 600-700bp ilgio sekos buvo apjungiamos į vientisą seką, naudojant DNASTAR programą SeqManTMII kelią. Sekos persidengė tarpusavyje 2-4 kartus, kas buvo būtina rezultatų tikslumui.

Sekų palyginimas. Surinktų ir išsaugotų tiriamųjų rDNR sekų palyginimas buvo atliekamas DNASTAR MegAlign pagalba. Tiriamosios DNR sekos buvo sudedamos į programos langą ir toliau DNR sekų tyrimas buvo atliekamas pagal programos pagalbos rekomendacijas.

Gautos sekos buvo palygintos su NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) duomenų bazėje esančiomis fitoplazmų genų sekomis naudojant šios bazės internetinį įrankį BLAST pagal NCBI internetinėje svetainėje pateiktas rekomendacijas.

iPhyClassifier (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>) (Zhao et al., 2009) internetinis įrankis buvo panaudotas siekiant nustatyti fitoplazmų giminingumą atitinkamam fitoplazmų pogrupiui pagal gautas fitoplazmų 16S rRNR genų sekas. Taip pat tuo pačiu įrankiu buvo sudaryti sekų virtualios RFIP analizės profiliai. Visi veiksmai

buvo atlikti vadovaujantis šio įrankio svetainėje pateiktomis rekomendacijomis.

Nuskaitytos ir surinktos rDNR sekos kartu su iš tarptautinio Genų banko duomenų bazės (GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov) gautomis sekomis buvo analizuojamos, konstruojant filogenetinius evoliucinius medžius. Taip buvo nustatytas fitoplazmų giminingumas ir evoliucija. Filogenetiniai medžiai buvo konstruojami naudojant MEGA5.2 kompiuterinę programą (Tamura et. al., 2011). Iš pradžių paruoštos vienodo ilgio 16S rDNR sekos buvo išsaugomos Microsoft notepad programoje, pagal medžių konstravimo programų gamintojų rekomendacijas Text only formatu. Po to buvo atidaroma MEGA5.2, ClustalX programa, ir tiriamos sekos sudedamos į atitinkamą langą. Sekos buvo palyginimos, pašalinamos sekų vietos su iškritomis ir nubraižomas Neighborn joining (N-J) medis, naudojant artimiausių grupių apjungimo metodą pagal 1000 medžių statistinio patikimumo analizę. Atskaitos tašku buvo pasirinkta *Acholeplasma laidlawii* ribosominių baltymų seka ir *Acholeplasma palmae* rDNR seka, kaip labiausiai filogenetiškai nutolusio protėvinio organizmo seka, ir toliau TreeView arba MEGA5.2 programoje, buvo gaunamas filogenetinis evoliucinis medis. Filogenetinis medis buvo atitinkamai apipavidalinamas įvairiomis kompiuterinėmis grafinėmis programomis.

3. DARBO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Identifikuotos vabzdžių ir augalų rūšys

Tyrimo metu buvo surinkti vabzdžių pavyzdžiai priklausantys 35 *Hemiptera* būrio rūšims: aštuonios iš jų identifikuotos iki genties lygio. (3.1 lentelė).

3.1. lentelė: Vabzdžių rūšys ir gentys.

Vabzdžio rūšis	Vieta	Data
Pobūris: <i>Auchenorrhyncha</i>		
Antšėmis: <i>Cercopoidea</i>		
Šeima: <i>Aphrophoridae</i>		
<i>Aphrophora alni</i>	Dvarčionys, Vilniaus r.	2012.08.25
<i>Aphrophora alni</i>	Mažieji Gulbinai, Vilniaus r.	2012.08.30
<i>Aphrophora alni</i>	Muniškiai, Kauno r.	2012.08.07
<i>Aphrophora alni</i>	Muniškiai, Kauno r.	2010.08.28
<i>Lepyronia coleoptrata</i>	Muniškiai, Kauno r.	2012.08.12
<i>Neophilaenus sp.</i>	Muniškiai, Kauno r.	2010.09.08
<i>Philaenus spumarius</i>	Dvarčionys, Vilniaus r.	2012.08.24
<i>Philaenus spumarius</i>	Mažieji Gulbinai, Vilniaus r.	2012.08.29
<i>Philaenus spumarius</i>	Muniškiai, Kauno r.	2012.08.09
<i>Philaenus spumarius</i>	Muniškiai, Kauno r.	2010.09.09
Antšėmis: <i>Membracoidea</i>		
Šeima: <i>Cicadellidae</i>		
Pošėmis: <i>Agalliinae</i>		
<i>Agallia sp.</i>	Muniškiai, Kauno r.	2010.08.25
<i>Anaceratagallia ribauti</i>	Muniškiai, Kauno r.	2010.08.26
Pošėmis: <i>Aphrodinae</i>		
<i>Aphrodes sp.</i>	Mažieji Gulbinai, Vilniaus r.	2012.08.31
<i>Aphrodes sp.</i>	Muniškiai, Kauno r.	2012.08.08
<i>Aphrodes sp.</i>	Muniškiai, Kauno r.	2010.08.27
Pošėmis: <i>Deltocephalinae</i>		
<i>Arthaldeus pascuellus</i>	Muniškiai, Kauno r.	2010.08.29
<i>Arthaldeus pascuellus</i>	Muniškiai, Kauno r.	2012.08.02
<i>Arthaldeus striifrons</i>	Muniškiai, Kauno r.	2010.08.30
<i>Arthaldeus striifrons</i>	Muniškiai, Kauno r.	2012.08.02
<i>Athysanus sp.</i>	Muniškiai, Kauno r.	2010.08.31
<i>Balclutha calamagrostis</i>	Mažieji Gulbinai, Vilniaus r.	2012.08.23

<i>Balclutha punctata</i>	Muniškiai, Kauno r.	2010.09.01
<i>Elymana sulphurella</i>	Muniškiai, Kauno r.	2012.08.02
<i>Elymana sulphurella</i>	Mažieji Gulbinai, Vilniaus r.	2012.08.23
<i>Errastunus ocellaris</i>	Muniškiai, Kauno r.	2010.09.03
<i>Euscelis incisus</i>	Muniškiai, Kauno r.	2012.08.11
<i>Euscelis incisus</i>	Muniškiai, Kauno r.	2010.09.04
<i>Graphocraerus ventralis</i>	Muniškiai, Kauno r.	2010.09.05
<i>Jassargus flori</i>	Mažieji Gulbinai, Vilniaus r.	2012.08.23
<i>Macrosteles cristatus</i>	Mažieji Gulbinai, Vilniaus r.	2012.08.23
<i>Macrosteles sexnotatus</i>	Muniškiai, Kauno r.	2010.09.06
<i>Macrosteles sexnotatus</i>	Dvarčionys, Vilniaus r.	2012.08.24
<i>Macrosteles sp.</i>	Muniškiai, Kauno r.	2010.09.07
<i>Macrosteles sp.</i>	Muniškiai, Kauno r.	2012.08.02
<i>Psammotettix alienus</i>	Muniškiai, Kauno r.	2010.09.10
<i>Psammotettix confinis</i>	Muniškiai, Kauno r.	2012.08.02
<i>Psammotettix confinis</i>	Mažieji Gulbinai, Vilniaus r.	2012.08.23
<i>Psammotettix sp.</i>	Mažieji Gulbinai, Vilniaus r.	2012.08.23
<i>Sagatus sp.</i>	Muniškiai, Kauno r.	2010.09.11
<i>Verdanus abdominalis</i>	Muniškiai, Kauno r.	2012.08.02
Pošėmis: Cicadellinae		
<i>Cicadella viridis</i>	Mažieji Gulbinai, Vilniaus r.	2012.08.10
<i>Cicadella viridis</i>	Muniškiai, Kauno r.	2010.09.02
Pošėmis: Typhlocibinae		
<i>Chlorita paolii</i>	Muniškiai, Kauno r.	2012.08.02
<i>Chlorita paolii</i>	Mažieji Gulbinai, Vilniaus r.	2012.08.23
<i>Edwardsiana sp.</i>	Muniškiai, Kauno r.	2012.08.02
<i>Edwardsiana sp.</i>	Žiežmariai, Kaišiadorių r.	2012.08.02
<i>Edwardsiana sp.</i>	Dvarčionys, Vilniaus r.	2012.08.24
<i>Empoasca vitis</i>	Dvarčionys, Vilniaus r.	2012.08.24
<i>Empoasca vitis</i>	Mažieji Gulbinai, Vilniaus r.	2012.08.23
<i>Eupteryx atropunctata</i>	Dvarčionys, Vilniaus r.	2012.08.24
<i>Notus flavipennis</i>	Mažieji Gulbinai, Vilniaus r.	2012.08.23
<i>Zygina flammigera</i>	Dvarčionys, Vilniaus r.	2012.08.24
Antšėmis: Fulgoroidea		
Šeima: Delphacidae		
Pošėmis: Delphacinae		
<i>Javesella pellucida</i>	Muniškiai, Kauno r.	2012.08.02
<i>Javesella pellucida</i>	Mažieji Gulbinai, Vilniaus r.	2012.08.23
<i>Xanthodelphax straminea</i>	Muniškiai, Kauno r.	2012.08.02
Pošėmis: Stenocraninae		
<i>Stenocranus minutus</i>	Dvarčionys, Vilniaus r.	2012.08.24
<i>Stenocranus minutus</i>	Mažieji Gulbinai, Vilniaus r.	2012.08.23
Pobūris: Sternorrhyncha		
Antšėmis: Psylloidea		

Šeima: <i>Psyllidae</i>		
<i>Cacopsylla mali</i>	Muniškiai, Kauno r.	2012.08.02
<i>Cacopsylla mali</i>	Žiežmariai, Kaišiadorių r.	2012.08.02

Surinkti augalų pavyzdžiai priklauso 39 rūšims: trys iš jų identifikuotos iki genties lygio (3.2 lentelė).

3.2. lentelė: Visų surinktų ir bandymams naudotų simptomatinių augalų sąrašas.

Augalo rūšis	Vietovė	Simptomai
<i>Allium cepa</i> L. – Valgomasis svogūnas	Babtai, Kauno r.	Filodija
<i>Alnus glutinosa</i> (L.) Gaerth. – Juodalksnis	Tamošava, Trakų r.	Pageltimas
<i>Apium graveolens</i> L. – Salieras lapinis	Tamošava, Trakų r.	Pageltimas
<i>Armoracia rusticana</i> P.Gaertn., B. Mey et Scherb. – Valgomasis krienas	Punia, Alytaus r.	Pageltę lapo pakraščiai, gyslos ryškiai geltonos, sunykęs žiedas
<i>Campanula</i> sp. L. – Katilėlis	Punia, Alytaus r.	Filodija
<i>Cannabis sativa</i> L. – Sėjamoji kanapė	Tamošava, Trakų r.	Pageltimas
<i>Caragana arborescens</i> Lam. – Paprastoji karagana	Merkinės piliakalnis, Varėnos r.	Krūmijimas
<i>Centaureum erythraea</i> Rafn – Skėtinė širdažolė	Muniškiai, Kauno r.	Pageltimas, žemaūgė, krūmijimas
<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop. – Dirvinė usnis	Muniškiai, Kauno r.	Šakojimasis, pageltimas, žemaūgė
<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop. – Dirvinė usnis	Balbieriškis, Prienu r.	Pabalę lapai
<i>Convolvulus arvensis</i> L. – Dirvinis vijoklis	Liškiavos piliakalnis, Varėnos r.	Pageltimas
<i>Dactylis glomerata</i> L. – Paprastoji šunažolė	Muniškiai, Kauno r.	Pageltimas, žemaūgė
<i>Echinops sphaerocephalus</i> L. – Apskritagalvis bandrenis	Merkinės piliakalnis, Varėnos r.	Pageltimas, krūmijimas
<i>Epilobium</i> sp. – Ožkarožė	Muniškiai,	Šakojimasis,

	Kauno r.	pageltimas
<i>Euonymus europeatus</i> L. – Europinis ožekšnis	Punia, Alytaus r.	Pagelte viršūniniai lapai, susiraukšlėję, patankėję
<i>Fragaria x ananassa</i> Duchesne – Braškės	Dvarčionys, Vilniaus r.	Filodija, žemaūgė
<i>Malva</i> sp. – Dedešva	Tamošava, Trakų r.	Pageltimas
<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Pall. – Geltonžiedis barkūnas	Merkinės piliakalnis, Varėnos r.	Pageltimas
<i>Oenotera rubricaulis</i> Kleb. – Nakviša raudonstiebė	Liškiavos piliakalnis, Varėnos r.	Šakota stiebo viršūnelė
<i>Origanum vulgare</i> L. – Paprastasis raudonėlis	Babtai, Kauno r.	Filodija
<i>Picea abies</i> (L.) Karst. – Paprastoji eglė	Girionys, Kauno r.	Pageltimas, šakojimasis
<i>Picris hieracioides</i> L. – Paprastasis kartylis	Muniškiai, Kauno r.	Pageltimas
<i>Pinus sylvestris</i> L. – Paprastoji pušis	Liškiava, Varėnos r., Girionys, Kauno r.	Raganų šluotos, spyglių susmulkėjimas, apmirimas
<i>Populus</i> sp. – Tuopa	Tamošava, Trakų r.	Raganų šluotos, pageltimas
<i>Prunus avium</i> (L.) L. – Trešnė	Muniškiai, Kauno r.	Pageltimas, apmirimas
<i>Prunus avium</i> (L.) L. – Trešnė	Babtai, Kauno r.	Apmirimas
<i>Prunus cerasus</i> L. – Paprastoji vyšnia	Babtai, Kauno r.	Apmirimas, vėlyvas žydėjimas, šakojimasis
<i>Prunus domestica</i> L. – Slyva	Muniškiai, Kauno r.	Šakalės su lapų proliferacija, pageltimas
<i>Quercus robur</i> L. – Paprastasis ažuolas	Liškiavos piliakalnis, Varėnos r.	Pageltimas, sumažėję lapai
<i>Ribes nigrum</i> L. – Juodasis serbentas	Vilniaus r.	Šakelių deformacija, sutrumpėjimas
<i>Rosa rugosa</i> Thunb. – Raukšlėtalapis	Liškiavos	Krūmijimas

erškėtis	piliakalnis, Varėnos r.	
<i>Rubus idaeus</i> L. – Avietė	Vilniaus r.	Pageltimas
<i>Scorzonera hispanica</i> L. – Valgomosios gelteklės	Tamošava, Trakų r.	Pageltimas
<i>Syringa vulgaris</i> L. – Paprastosios alyvos	Tamošava, Trakų r.	Apmirimas, pageltimas
<i>Stellaria media</i> – Žliugė	Vilniaus r.	Filodija
<i>Taraxacum officinale</i> F. H. Wigg – Paprastoji kiaulpienė	Muniškiai, Kauno r.	Pageltimas, filodija, lapų deformacija
<i>Thalictrum minus</i> L. – Mažasis vingiris	Merkinės piliakalnis, Varėnos r.	Pageltimas
<i>Trifolium pratense</i> L. – Raudonasis dobilas	Muniškiai, Kauno r.	Filodija
<i>Trifolium repens</i> L. – Baltasis dobilas	Babtai, Kauno r.	Žemaugė, filodija
<i>Valeriana officinalis</i> L. – Vaistinis valerijonas	Babtai, Kauno r.	Pageltimas
<i>Vincetoxicum luteum</i> Woffrugg. Et Link. – Kregždūnė	Liškiavos piliakalnis, Varėnos r.	Pageltimas

3.2. Dar neištirtos galimų pernešėjų rūšys

Tyrimo metu buvo ištirti vabzdžių pavyzdžiai priklausantys vienuolikai rūšių. Likę 24 rūšių vabzdžių pavyzdžiai dar netirti, tačiau kai kurie iš jų jau žinomi kaip galimi fitoplazmų pernešėjai.

Balclutha punctata Fabricius 1775 paminėta, kaip šilkmedžio žemaugės (16SrI-B fitoplazmų pogrupis) (Han, 2012) bei dar keturių fitoplazmų grupių Aliaskoje (Pantoja et al., 2009) pernešėja. *Balclutha* genties vabzdžiai yra galimi migdolų raganų šluotos (16SrIX fitoplazmų pogrupis) (Dakhil et al., 2011) ir stolburo (16SrXII-A fitoplazmų pogrupis) (Riedle-Bauer et al., 2006) sukėlėjų platintojai.

Errastunus ocellaris (Fallen 1806) vabzdžių pavyzdžiuose buvo aptiktos stolburo fitoplazmos (Riedle-Bauer et al., 2006) bei 16SrI-F pogrupio fitoplazmos (Orságová et al., 2011).

Javesella pellucida (Fabricius 1794) rūšis žinoma kaip galima 16SrI-C ir 16SrI-F pogrupio fitoplazmų pernešėja (Orságová et al., 2011). Taip pat ji yra OSDV (angl. – Oat Sterile Dwarf Virus), MRDV (angl. – Maize Rough Dwarf Virus) ir EWSMV (angl. – European Wheat Striate Mosaic Virus) virusų platintoja (Kunz et al., 2010).

Macrosteles cristatus (Ribaut 1927) rūšies vabzdžiai užfiksuoti kaip dobilų filodijos (16SrI-C fitoplazmų pogrupis), dobilų žemaūgės (16SrIII-B fitoplazmų pogrupis) (Weintraub, Beanland, 2006) bei stolburo (16SrXII-A fitoplazmų pogrupis) pernešėjai (Březíková et al., 2007).

Psammotettix genties cikadelės: *P. alienus*, *P. confinis* Europoje yra žinomos kaip stolburo (16SrXII-A fitoplazmų pogrupis) platintojos (Fos et al., 1992). *P. confinis* cikadelėse buvo aptiktos 16SrI-A ir 16SrI-C pogrupių fitoplazmos (Drobnjaković et al., 2011), todėl jas galima priskirti galimiems šių pogrupių pernešėjams Lietuvoje. *P. alienus* rūšis identifikuojama kaip BMWR (angl. – band mosaic of wheat and rye) ir WDV (angl. – Wheat Dwarf Virus) virusų platintoja (Kunz et al., 2010).

3.3. 16SrI grupės fitoplazmos

Šios grupės fitoplazmos yra vienos iš dažniausiai aptinkamų Lietuvoje. Tyrimo metu surinktuose įvairiose Lietuvos vietovėse vabzdžių ir augalų pavyzdžiuose aptiktos 16SrI-A, 16SrI-B ir 16SrI-C pogrupių fitoplazmos.

3.3.1. 16SrI-A pogrupo fitoplazmos

Simptomatinių augalų (3.1. pav.) pavyzdžiai buvo surinkti Kauno ir Vilniaus rajonuose. Tose pačiose vietovėse surinkti vabzdžių pavyzdžiai nuo

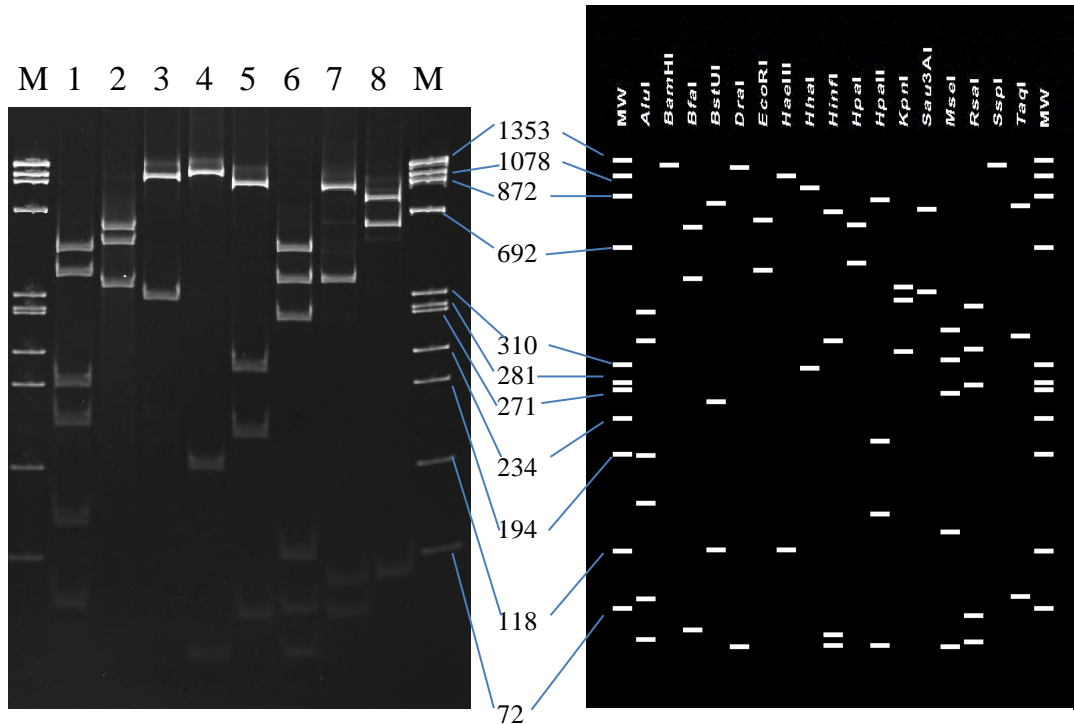


3.1. pav.: **A** - Eglės infekuotos 16SrI-A pogrupo fitoplazma simptomai: spyglių pageltimas, šakojimasis, žemaūgė. Girionys, Kauno r.
B - Braškių infekuotų 16SrI-A pogrupo fitoplazma simptomai: žemaūgė, filodija. Dvarčionys, Vilniaus r..

augalų su fitoplazminiais simptomais.

Iš augalų bei vabzdžių pavyzdžių išskirta bendra DNR buvo panaudota lizdinėje PGR reakcijoje su fitoplazmų universaliais pradmenimis P1A/16S-Sr (Lee et al., 2003; Lee et al., 2006) ir R16F2n/R16R2n (Lee et al., 2006). Gautas 1,2 kbp dydžio fitoplazmos rDNR fragmentas patvirtino fitoplazminę infekciją *Stenocranus minutus* cikadelėse, paprastojoje eglėje (*Picea abies* (L.) H. Karst.) bei braškėje (*Fragaria x ananassa* Duchesne). Atlikus pagausinto fragmento RFIP analizę su devyniomis restrikcijos endonukleazėmis (3.2. pav.), fitoplazma pagal literatūroje pateiktą fitoplazmų klasifikacijos schemą (Lee et al., 1998) buvo priskirta 16SrI grupei, I-A pogrūpiui (pomidorų geltos (angl. - tomato big bud) pogrūpis). Nuo kitų 16SrI grupės fitoplazmų išsiskyrė *Bfa*I endonukleazės sukuriamu profiliu.

Iš eglės pavyzdžių pagausinti 16S rRNR geno ir ribosominio baltymo (*rpl22/rps3*) geno fragmentai naudojant klonavimo rinkinį su pUC57



3.2. pav.: Fitoplazmos priskirtos 16SrI-A pogrūpiui 16S rRNR geno RFIP analizės profilis. 1-*AluI*, 2- *KpnI*; 3-*HhaI*; 4-*HaeIII*; 5-*HpaII*; 6-*RsaI*; 7-*HinfI*; 8-*BfaI*; M- markeris (phiX174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) fragmentų dydžiai: 1353, 1078, 872, 692, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp).

3.3 pav.: 16SrI-A pogrūpiui fitoplazmos 16S rRNR geno sekos gautos iš eglės virtualios RFIP analizės profilis sudarytas naudojant *iPhyClassifier* (Zhao et al., 2009). (MW- markeris phiX174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) fragmentų dydžiai: 1353, 1078, 872, 692, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp).

klonavimo vektoriumi buvo klonuoti į *E. coli*. Atrinkti klonai nusiųsti į sekoskaitos įmonę. Nuskaityta 16S rDNR ir ribosominio baltymo geno seka buvo palyginta su kitais fitoplazmų kamienais naudojantis NCBI duomenų bazės internetiniu įrankiu BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSear&LINK_LOC=blasthome). Palyginimas parodė, kad tiriamos fitoplazmos sekos turi didžiausią panašumą su 16SrI-A pogrūpiui fitoplazmų sekomis. Tai pat naudojantis *iPhyClassifier* (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>)

internetiniu įrankiu buvo patvirtintas giminingumas su 16SrI-A fitoplazmų pogrupiu bei sudarytas RFIP analizės virtualaus gelio atvaizdas (3.3. pav.), kuris buvo palygintas su Zhao et. al. (2009) ir Lee et al. (1998) klasifikacijos schemos atvaizdais.

Apibendrinimas: 16SrI-A pogrupio fitoplazmos priklauso vienai didžiausių astrų geltos (angl. - aster yellows) grupei. Šio pogrupio kamienai aptikti Kanadoje, JAV Teksaso valstijoje, Serbijoje bei Rusijoje (Khadhair et al., 2002; Lee et al., 2003; Girsova et al., 2008; Drobnjaković et al., 2011).

Lietuvoje ankstesnių tyrimų metu šio pogrupio fitoplazmos buvo aptiktos plačiame augalų rate. Jos buvo aptiktos naudinguosiuose augaluose: morkose (*Daucus sativus* Röhl.) (Valiūnas, 2003); sėjamosiose avižose (*Avena sativa* L.) (Jomantiene et al., 2002b; Urbanaviciene et al., 2007), svogūnuose (*Allium cepa* L.) (Jomantiene et al., 2010) bei įvairiuose dekoratyviniuose augaluose mėlynosiose kurlpelėse (*Aconitum napellus* L.), karpytalapiuose kermėkuose (*Limonium sinuatum* (L.) Mill.), rytiniuose hiacintuose (*Hyacinthus orientalis* L.) daugiametėje saulutėje (*Bellis perennis* L.), puošniosiose gailiardijose (*Gaillardia pulchella* Foug.), rudbekijose (*Rudbeckia hirta* L.), saulainėse (*Helenium autumnale* L.), mietveinėse (*Pachysandra terminalis* (Siebold & Zucc.)), auskarėliuose (*Dicentra formosa* (Haw.) Walp.), kardeliuose (*Gladiolus* sp. L.), raguoliuose (*Consolida ajacis* (L.) Schur), eleboruose (*Helleborus lividus* Aiton), kininiuose burbuliuose (*Trollius chinensis* Bunge), žiogmagėse (*Geum coccineum* Lindl.) (Valiūnas, 2003; Samuitienė et al., 2007).

Mūsų duomenys parodė, kad *S. minutus* vabzdžių rūšis yra galima 16SrI-A pogrupio fitoplazmos pernešėja mūsų regione. Vietovėje, kur buvo sugauti šie vabzdžiai taip pat buvo aptiktos braškės infekuotos ta pačia 16SrI-A pogrupio fitoplazma. Pagal literatūros duomenis šie vabzdžiai minta išskirtinai ant *Dactylis* genties augalų, todėl tikėtina, jog ši rūšis atsitiktinai gali platinti arba pasisavinti šias bakterijas nuo braškių.

Duomenų apie šiose cikadelėse aptiktas ar pernešamas fitoplazmas mūsų regione bei pasaulyje aptikti nepavyko, todėl tyrimo rezultatai papildo 16SrI-A pogrupio šeimininkų bei galimų platintojų spektrą.

Lietuvoje 16SrI-A pogrupio fitoplazmos eglėje bei braškėje aptiktos pirmą kartą. Lenkijoje šio pogrupio fitoplazmos buvo aptiktos dygiojoje eglėje (*Picea pungens* Engelm.) (Kaminska et al., 2011). Lietuvoje braškėse taip pat aptinkamos 16SrXII-E ('*Candidatus* Phytoplasma fragariae' - braškių geltos) pogrupio fitoplazmos (Valiunas et al., 2006).

3.3.2. 16SrI-B pogrupio fitoplazmos

Tyrimams simptomatinių augalų (3.4. pav.) ir vabzdžių pavyzdžiai, kuriuose buvo aptiktos 16SrI-B pogrupio fitoplazmos, surinkti Kaišiadorių,



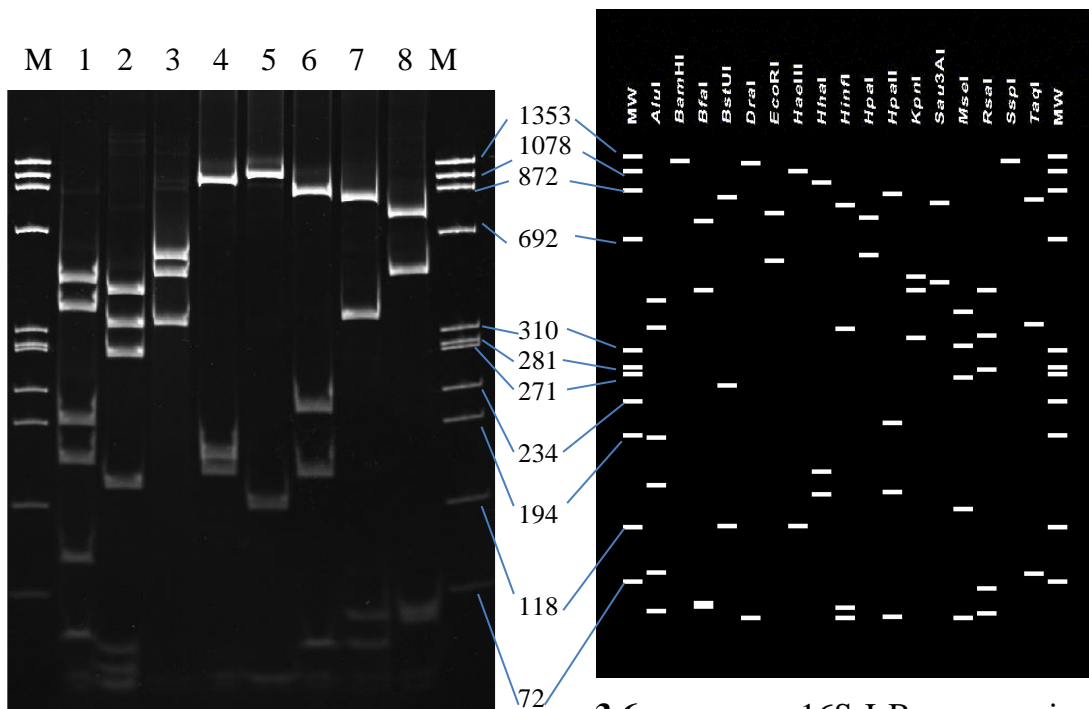
3.4. pav.: A-Raudonųjų dobilų infekuotų 16SrI-B pogrupio fitoplazma simptomai: filodija, lapų paraudimas. Muniškiai, Kauno r..

B-Trešnės infekuotos 16SrI-B pogrupio fitoplazma simptomai: apmirimas. Kauno r..

C-Obels infekuotos 16SrI-B pogrupio fitoplazma simptomai: pageltimas, šakojimasis, apmirimas. Kaišiadorių r..

Kauno ir Vilniaus rajonuose. Pagausus 1,2 kb dydžio 16S rDNR fragmentą, lizdinės PGR metodu, fitoplazminės infekcijos buvo nustatytos vabzdžių: *A. alni*, *Aphrodes* sp., *C. mali*, *C. viridis*, *L. coleoptrata*, *P. spumarius*

pavyzdžiuose bei augalų: kaukazinės slyvos (*Prunus cerasifera*), obels (*Malus domestica*), paprastojo kartilio (*Picris hieracioides*), raudonojo dobilo (*Trifolium pratense*), slyvos (*Prunus domestica*), širdažolės (*Centaureum erythraea*), šunažolės (*Dactylis glomerata*), juodojo serbento (*Ribes nigrum*), valgomosios gelteklės (*Scorzonera hispanica* L.) ir žliūgės (*Stellaria media* (L.) Vill.) pavyzdžiuose. Atlikus gautų fragmentų RFIP analizę bei palyginus gautus profilius (3.5. pav.) su fitoplazmų klasifikacijos schemos profiliais, nustatyta, kad fitoplazmos priklauso fitoplazmų 16SrI grupės B pogrūpiui (pagal *HhaI* profilį).



3.5. pav.: Fitoplazmos priskirtos 16SrI-B pogrūpiui 16S rRNR geno RFIP analizės profilis. 1-*AluI*, 2-*MseI*; 3-*KpnI*; 4-*HhaI*; 5-*HaeIII*; 6-*HpaII*; 7-*HinfI*; 8-*BfaI*; M-markeris (phiX174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) fragmentų dydžiai: 1353, 1078, 872, 692, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp).

3.6. pav.: 16SrI-B pogrūpio fitoplazmos 16S rRNR geno sekos iš AY1A112 kamieno (GenBank no. KC283215) virtualios RFIP analizės profilis sudarytas naudojant *iPhyClassifier* (Zhao et al., 2009). (MW- markeris phiX174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) fragmentų dydžiai: 1353, 1078, 872, 692, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp).

16S rDNR ir ribosominių baltymų pagausinti fragmentai, gauti iš augalų kaukazinės slyvos, valgomosios gelteklės bei vabzdžių *C. viridis*, *Aphrodes* sp.

pavyzdžių buvo klonuoti į *E. coli*. Sekoskaitai klonai buvo atrinkti pagal PGR reakcijų rezultatus ir RFIP analizės profilius. Sekoskaita atlikta Lietuvos bei užsienio sekoskaitos įmonėse. Gautos sekos buvo palygintos su NCBI duomenų bazėje esančiomis fitoplazmų sekomis ir tai leido patvirtinti, kad tiriamą fitoplazmą priklauso 16SrI-B ir rpI-B pogrupiui. Sekų analizė, panaudojant *iPhyClassifier* internetinį įrankį bei jo pagalba sudarytas virtualus gelio atvaizdas (3.6. pav.), patvirtino gautus duomenis.

Apibendrinimas: 16SrI-B pogrupio fitoplazmos sudaro didžiausią skirtingų kamienų telkinį 16SrI grupėje bei yra plačiai paplitusios visame pasaulyje žoliniuose ir sumedėjusiuose augaluose (Lee et al., 1998; Lee et al., 2004).

Lietuvoje kiti tyrėjai šias bakterijas aptiko liucernose (*Medicago sativa* L.) (Jomantiene et al., 2000), gluosniuose (*Salix* sp.), karaganose (*Caragana arborescens* Lam.), trešnėse (*Prunus avium*), vyšniuose (*Prunus cerasus*), vaistiniuose valerijonuose (*Valeriana officinalis* L.), kriaušėse (*Pyrus communis* L.) (Valiūnas, 2003; Valiunas et al., 2009). Urbanavičienė et al., 2005; 2006; 2007) 16SrI-B pogrupio fitoplazmas aptiko tokiuose svarbiuose žemės ūkiui augaluose, kaip avižos (*A. sativa*) ir miežiai (*Hordeum vulgare* L.). Samuitienė et al. (2007) jas aptiko eilėje dekoratyvinių augalų: goštautinėse gaisrenose (*Lychnis chalconica* L), naktiziedėse (*Silene orientalis* Hort.), šilokuose (*Sedum spectabile* Boreau), darželinuose pentiniuose (*Delphinium cultorum*), skeltažiedžiuose (*Schizanthus pinnatus* Ruiz et Pav.).

A. alni vabzdžiai literatūroje minimi, kaip galimi fitoplazmos sukeliančios obelų proliferaciją (16SrX-A fitoplazmų pogrupis) platintojai, tačiau to patvirtinti dar nepavyko (Seemüller et al., 1990).

Vyriškos lyties individų trūkumas leido tyrimo metu aptiktus *Aphrodes* sp. genties vabzdžių pavyzdžius klasifikuoti tik iki genties lygio. Europoje *A. bicincta* cikadelių rūšis patvirtinta, kaip 16SrI-A, 16SrI-C, 16SrIII-B, 16SrIV ir 16SrXII-A (stolburas) fitoplazmų pogrupių pernešėja (Brčák, 1979; Lee et al., 1998; Weintraub, Beanland, 2006).

Šiaurės Italijoje *C. mali* pavyzdžiuose buvo aptiktos obelių proliferacijos fitoplazmos (16SrX-A fitoplazmų pogrupis) (Baric et al., 2010). Keletas šios genties rūšių: *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pruni*, *C. pyri*, *C. pyricola*, *C. pyrisuga* yra pagrindiniai fitoplazmų sukeliančių tokių ligų epidemijas, kaip obelių proliferacija (16SrX-A fitoplazmų pogrupis), Europos kaulavaisių gelta (16SrX-B) bei kriaušių apmirimas (16SrX-C) platintojai (Weintraub, Beanland 2006).

Mažai yra žinoma apie *C. viridis* vabzdžiuose aptinkamas fitoplazmas. Tik Mazzoni (2001) su bendraautoriais paminėjo šį vabzdį, kaip galimą geltligių pernešėją.

Kiti tyrėjai *P. spumarius* vabzdžiuose aptiko 16SrI-F pogrupio (Orságová et al., 2011), 16SrV grupės (Matteoni, Sinclair, 1988), 16SrIII-A pogrupio (Landi et al., 2007) ir 16SrX grupės fitoplazmų (obelių proliferacijos fitoplazmų grupė) (Seemüller, 1990).

L. coleoptrata rūšis paminėta, kaip galima obelių proliferacijos fitoplazmos (16SrX-A fitoplazmų pogrupis) pernešėja (Seemüller, 1990).

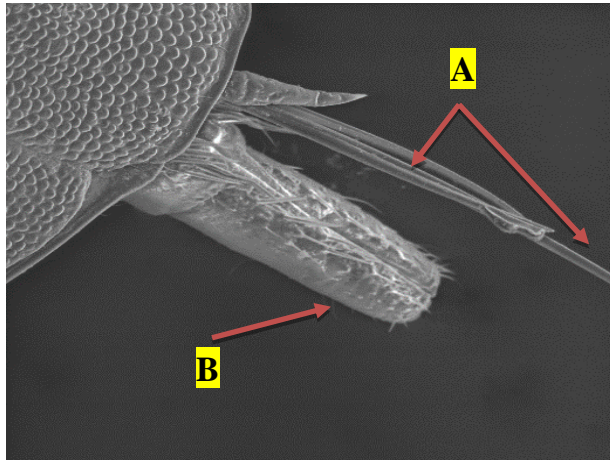
Mūsų tyrimo duomenimis *A. alni*, *Aphrodes* sp., *C. mali*, *C. viridis*, *P. spumarius*, *L. coleoptrata* pavyzdžiuose 16SrI-B pogrupio fitoplazmos Lietuvoje ir pasaulyje buvo aptiktos pirmą kartą – tai praplečia aptinkamų fitoplazmų įvairovę šiose cikadelėse.

A. alni, *Aphrodes* sp., *C. mali*, *C. viridis*, *P. spumarius*, *L. coleoptrata* galima priskirti galimiems 16SrI-B pogrupio platintojams Lietuvoje bei mūsų regione.

Pagal literatūrinius duomenis *A. alni*, *Aphrodes* sp., *C. viridis*, *P. spumarius*, *L. coleoptrata* rūšies vabzdžiai yra polifagai bei sugeba maitintis ne tik ant žolinių, bet ir ant sumedėjusių augalų, todėl juos galima įvardinti, kaip galimus 16SrI-B pogrupio fitoplazmų platintojus tarp augalų, kuriuose buvo aptiktos šio pogrupio fitoplazmos mūsų ir ankstesnių tyrimų metu.

A. alni, *C. viridis*, *L. coleoptrata*, *P. spumarius* priklauso *Auchenorrhyncha* vabzdžių grupei, kuri minta tik medienos indų ląstelių sultimis (Purcell, 2008; Weintraub, Wilson, 2010). Mūsų tyrimo metu šiuose

cikadelėse buvo aptiktos fitoplazmos, kas patvirtina Crews et al. (1998) tyrimo



3.7. pav.: Cikadelės burnos aparatas.

A – Stiletai

B – Labium

rezultatus, kad pozicionuodami savo stiletus (3.7. pav. A), šie vabzdžiai gali pradurti karnienos ląsteles bei įsiurbti jų turinį. Taip pat Rosa et al. (2014) nustatė, kad *Lepyronia quadrangularis* Say gali pernešti 16SrV grupės fitoplazmas fitoplazmas. Remiantis šiais duomenimis, į šiuos vabzdžius reikėtų žiūrėti ne tik kaip į juose aptiktų fitoplazmų šeimininkus,

bet ir kaip į jų galimus pernešėjus.

C. mali yra monofaginė rūšis mintanti ant *Malus* genties augalų, todėl šią rūšį galima pripažinti galimu 16SrI-B pogrupio fitoplazmų platintoju tarp obelų Lietuvoje ir mūsų regione. Taip pat ji žinoma, kaip obelų proliferacijos fitoplazmos pernešėja, todėl svarbu vykdyti jos kontrolę.

3.3.3. 16SrI-C pogrupio fitoplazmos

Simptomatinių augalų (3.8. pav.) ir vabzdžių pavyzdžiai, kuriuose vėliau buvo aptiktos 16SrI-C pogrupio fitoplazmos, buvo surinkti iš pievų bei sodų esančių Kauno rajone.

Tyrimo metu 1,2 kbp dydžio 16S rDNR fragmentai lizdinės PGR metodu buvo gauti iš: *A. ribauti*, *Aphrodes* sp., *A. striifrons*, *E. incisus*, *L. coleoptrata*, *M. sexnotatus*, *P. spumarius*, kaukazinės slyvos (*Prunus cerasifera*), baltojo dobilo (*Trifolium repens*), dirvinės usnies (*Cirsium arvense*), bendros DNR pavyzdžių. Tai patvirtino fitoplazminę infekciją. Gauti fragmentai buvo panaudoti RFIP analizėje, kurios profiliai (3.9. pav.) buvo palyginti su

fitoplazmų klasifikacijos schemas žinomų fitoplazmų RFIP profiliais, pagal juos (skyriasi *AluI*, *MseI* profiliai) fitoplazmos buvo klasifikuotos į 16SrI grupės C pogrųpį.

Fitoplazmų pernešimo *E. incisus* cikadelėmis tarp baltųjų dobilų (*T. repens*) eksperimentų duomenys patvirtino šių vabzdžių gebėjimą pernešti 16SrI-C pogrųpio fitoplazmas tarp baltųjų dobilų Lietuvoje.

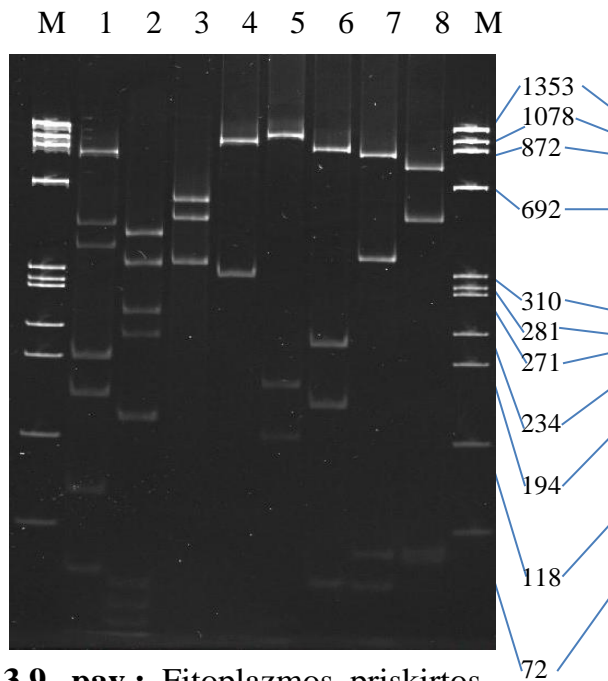


3.8. pav.: A - Usnių infekuotų 16SrI-C pogrųpio fitoplazma simptomai: žemaūgė, proliferacija. Muniškiai, Kauno r..

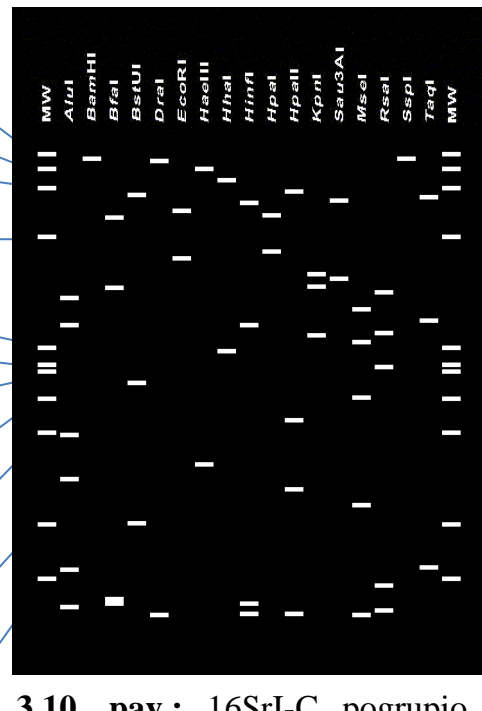
B - Baltųjų dobilų infekuotų 16SrI-C pogrųpio fitoplazma simptomai: filodija. Muniškiai, Kauno r..

A. ribauti, *Aphrodes* sp., *E. incisus*, *M. sexnotatus*, *P. spumarius* pavyzdžiuose aptiktų fitoplazmų markeriniai žymenys buvo klonuoti. Plazmidės iš atrinktų klonų buvo išskirtos ir nusiųstos sekoskaitai. Gautos sekos BLAST įrankio pagalba palygintos su NCBI duomenų bazėje esančių fitoplazmų sekomis. Naudojantis *iPhyClassifier* internetiniu įrankiu buvo gauti virtualūs RFIP analizės profiliai (3.10. pav.). Abi analizės parodė, kad tiriamų fitoplazmų sekos labiausiai panašios į 16SrI-C pogrųpio fitoplazmų sekas. Šis fitoplazmų pogrųpis išsiskiria ribosominių operonų heterogeniškumu, todėl abi analizės taip pat atskleidė sekų giminingumą *rrnA* arba *rrnB* ribosominiam operonui.

Analizuotos sekos buvo įkeltos į genų banko duomenų bazę (angl. – GenBank Database). Joms suteikti sekos numeriai: KC283213, KC283214, KC283218.



3.9. pav.: Fitoplazmos priskirtos 16SrI-C pogrūpiui 16S rRNR geno RFIP analizės profilis. Realioji RFIP analizė parodo abiejų heterogenišku operonų fragment profilis. 1-*AluI*, 2-*MseI*; 3-*KpnI*; 4-*HhaI*; 5-*HaeIII*; 6-*HpaII*; 7-*HinfI*; 8-*BfaI*; M-markeris (phiX174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) fragmentų dydžiai: 1353, 1078, 872, 692, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp).



3.10. pav.: 16SrI-C pogrūpio fitoplazmos 16S rRNR geno sekos CPhM15-7 (GenBank no. KC283214) virtualios RFIP analizės profilis sudarytas naudojant *iPhyClassifier* (Zhao et al., 2009). Matomas tik vieno iš dviejų: *rrnA* operono sekos analizės profilis. (MW-markeris phiX174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) fragmentų dydžiai: 1353, 1078, 872, 692, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp).

Apibendrinimas: Šio pogrūpio fitoplazmos paplitusios visame pasaulyje. Jos aptinkamos, kaip vienskilčiuose, taip ir dviskilčiuose augaluose (Lee et al., 2004).

Lietuvoje 16SrI-C pogrūpio fitoplazmos buvo aptiktos baltosiuose dobiluose (*Trifolium repens* L.) (Staniulis et al., 2000), pievinėse miglėse (*Poa pratensis* L.), gailiardijsuose (*Gaillardia aristata* Pursh) (Valiunas et al., 2007),

nendriniame eraičine (*Festuca arundinacea* Schreb.) (Urbanavičienė et al., 2006).

A. ribauti vabzdžių rūšis kitose Europos šalyse žinoma, kaip daug nuostolių žemės ūkiui atnešančios stolburo ligos, kurią sukelia 16SrXII-A pogrupio fitoplazma, platintoja (Riedle-Bauer et al., 2008; Drobnjaković et al., 2011).

E. incisus vabzdžiai žinomi, kaip dobilų filodijos (dabar žinomo, kaip 16SrI-C pogrupio fitoplazma), dobilų raganų šluotos, dobilų stolburo, dobilų žemaūgės ir parastolburo sukėlėjo pernešėjai (Nielson 1968). Šiuo metu yra patvirtinta, kad šios rūšies vabzdžiai sugeba pernešti fitoplazmų kamienus priklausančius 16SrI-B, 16SrI-C, 16SrVI ir 16SrXII-A pogrupiams (Brčák, 1979; Weintraub, Beanland, 2006). Taip pat šiuose vabzdžiuose buvo aptiktos 16SrI-F bei 16SrIII-B pogrupio fitoplazmos (Orságová et al., 2011).

M. sexnotatus rūšies cikadelės kituose regionuose žinomos kaip hiacintų „Lissers“ fitoplazmos, 16SrI-A, 16SrI-B, 16SrXII pogrupio fitoplazmų pernešėjos (Batlle, 2000, Weintraub, Beanland, 2006; Duduk et al., 2008).

Mūsų tyrimo metu *A. striifrons*, *L. coleoptrata*, *P. spumarius* vabzdžių pavyzdžiuose 16SrI-C pogrupio fitoplazmos Lietuvoje bei pasaulyje buvo aptiktos pirmą kartą. Šie duomenys praplečia aptinkamų fitoplazmų įvairovę šiose cikadelėse.

Tyrimo metu neaptikta literatūrinių duomenų apie tai, kokios fitoplazmos buvo aptiktos *A. striifrons* vabzdžiuose ir kokias fitoplazmas ši rūšis galėtų platinti kituose pasaulio regionuose. Mūsų duomenys praplatina galimų 16SrI-C pogrupio fitoplazmų galimų pernešėjų ratą.

A. ribauti, *Aphrodes* sp., *E. incisus* ir *M. sexnotatus* vabzdžių pavyzdžiuose 16SrI-C pogrupio fitoplazmos aptinkamos ir kitose šalyse, tačiau šio tyrimo metu Lietuvoje jos aptiktos pirmą kartą.

L. coleoptrata, *M. sexnotatus*, *P. spumarius* yra polifaginės, o *E. incisus*, oligofaginė rūšis (Nickel, Remane, 2002), todėl augalų ratas sudarantis jų fitoracioną gali būti labai platus ir persiklojantis. Žinoma, kad šios rūšys daugiau linkusios maitintis ant *Poaceae* ir *Fabaceae* šeimų augalų

(Ossiannilsson, 1981; 1983; Nickel, Remane, 2002), todėl didžiausia tikimybė, kad jos perneša fitoplazmas tarp šių šeimų augalų.

A. striifrons vabzdžiai yra monofagai ir dažniausiai maitinasi ant *Festuca* genties augalų (Nickel, Remane, 2002), todėl tikėtina, kad jie yra galimi 16SrI-C pogrupio fitoplazmos pernešėjai tarp nendrinių eraičinų.

A. ribauti ir *M. sexnotatus* rūšys yra patvirtintos, kaip stolburo fitoplazmos sukeliančios naudingųjų augalų epidemijas pernešėjos, todėl svarbu vykdyti jų kontrolę.

3.4. 16SrI grupės fitoplazmų filogenetiniai medžiai

Filogenetiniai medžiai (3.11.; 3.12.; 3.13. pav.) buvo sudaryti analizuojant gautas tyrimo metu ir paimtas iš NCBI genų banko žinomų fitoplazmų 16S rDNR, *rpl22/rps3* bei *secY* genų sekas.

16SrI grupės medis buvo sukurtas naudojant 46 fitoplazmų ir vienos acholeplazmos (*Acholeplasma palmae*) 16S rDNR sekas (3.11. pav.). Jis parodė giminingumus tarp anksčiau nustatytų bei mūsų tyrime aptiktų 16SrI-A, 16SrI-B ir 16SrI-C pogrupių fitoplazmų kamienų. Medžio šakojimasis patvirtino aptiktų fitoplazmų priskyrimą atitinkamiems 16SrI grupės pogrupiams.

16SrI-A pogrupio fitoplazma aptikta eglėje labiausiai gimininga Lietuvoje (oat proliferation, plantago virescence, gaillardia yellows) bei kituose pasaulio regionuose (Texas potato purple top, carrot phytoplasma sp.) aptiktom 16SrI-A pogrupio fitoplazmom.

Aphrodes sp. vabzdžių pavyzdžiuose aptikta 16SrI-B pogrupio fitoplazma didžiausią giminigumą parodė su Jungtinėse Amerikos Valstijose aptikta 16SrI-O pogrupio fitoplazma bei Lietuvoje aptikta *Scorzonera hispanica* 16SrI-B pogrupio fitoplazma.

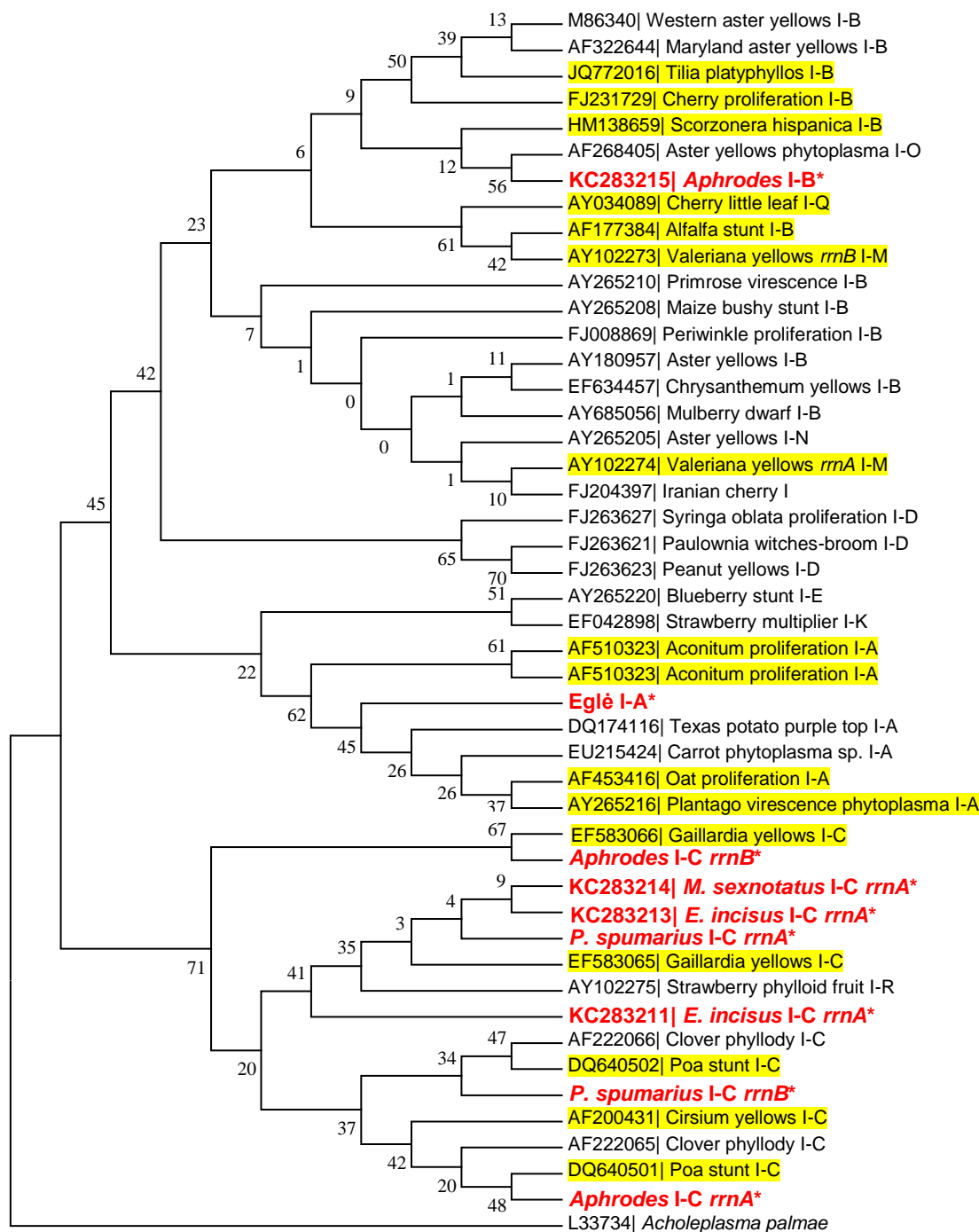
16SrI-C pogrupio fitoplazmų aptiktų *Aphrodes* sp., *E. incisus*, *M. sexnotatus* ir *P. spumarius* vabzdžiuose išsidėstymas ant filogenetinio medžio

šakų, parodo jų gimingumą su anksčiau Lietuvoje augaluose aptiktom gaillardia yellows, poa stunt, cirsium yellows fitoplazmom bei jų *rrnA* ir *rrnB* operonais.

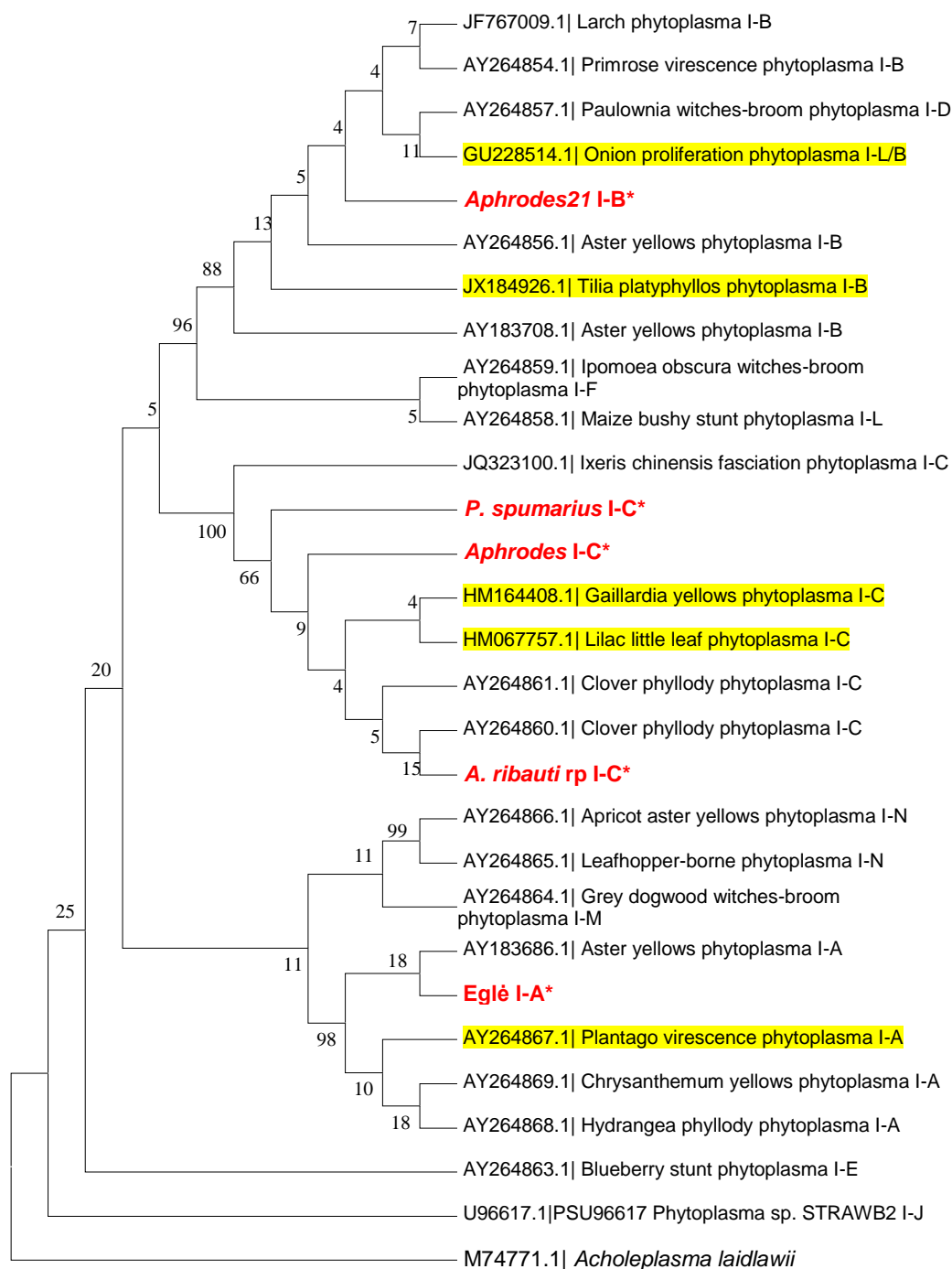
Filogenetinėje analizėje bei filogenetinių medžių konstravimui buvo panaudotos ne tik 16S rDNR bet ir pagalbinių žymenų: ribosominių baltymų (*rpl22/rps3*) ir sekrecinės sistemos (*secY*) genų sekos.

Ribosominių baltymų genų (*rpl22/rps3*) sekų filogenetinis medis (3.12. pav.) buvo sudarytas panaudojus 28 rpI grupės fitoplazmų ir 1 acholeplazmos (*Acholeplasma laidlawii*) *rpl22/rps3* genų sekas. Į analizę taip pat buvo įtraukta *rp* geno seka, gauta iš fitoplazmos, aptiktos maumedžio (*Larix* sp.) pavyzdžiuose iš Ukrainos. Medžio šakojimosi tvarka patvirtina fitoplazmų priskyrimą 16SrI-A;-B;-C pogrupiams. Ukrainoje paplitusi rpI-B pogrupio fitoplazma yra mažiau gimininga lietuviškajai ir išsiskiria į atskirą šaką.

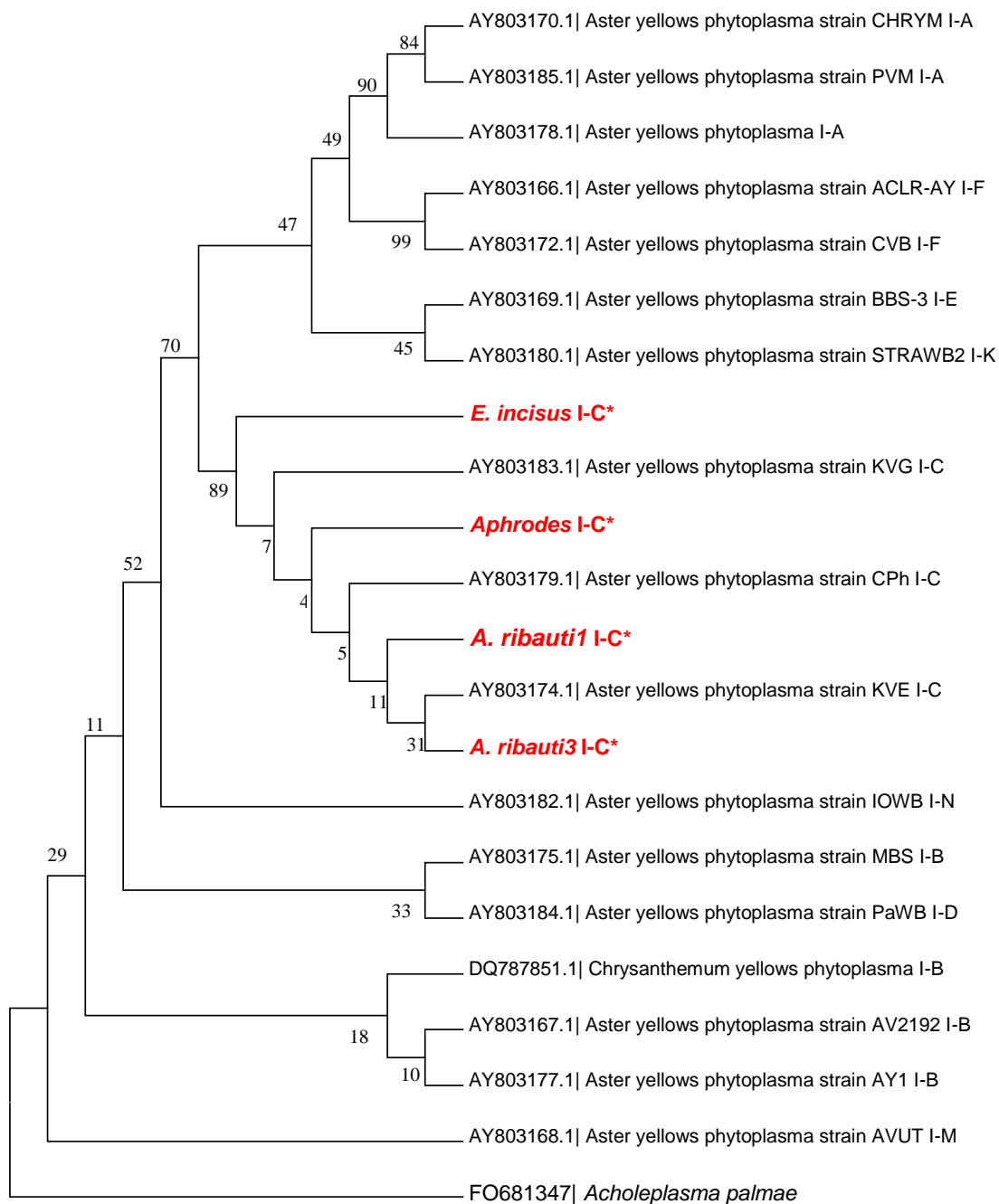
Sekrecinės sistemos baltymų geno sekų filogenetinis medis (3.13. pav.) sudarytas pagal 21 *secY-I* grupės fitoplazmų ir 1 acholeplazmos (*Acholeplasma laidlawii*) *secY* genų sekas. Medžio šakų išsidėstymas parodė, kad iš *Aphrodes* sp., *E. incisus*, *A. ribauti* gautos *secY* geno sekos labiausiai giminingos aster yellows fitoplazmų KVG, CPh ir KVE kamienams, kurie priklauso *secY-I-C* pogrupiui.



3.11. pav.: Filogenetiniame medyje pavaizduotas identifikuotų 16SrI-A, 16Sr-B ir 16Sr-C fitoplazmų pogrupių filogenetinis ryšys su kitais 16SrI grupės fitoplazmų atstovais. Fitoplazmų filogenetinis medis sukonstruotas pagal 46 fitoplazmų ir 1 acholeplazmos (*Acholeplasma palmae*) 16S rDNR. Acholeplazma pasirinkta bendru protėviu. Priekyje nurodomas genų banko sekos numeris. Romėniški skaičiai nurodo fitoplazmų 16S rDNR RFLP grupes, didžiosios raidės - pogrupius. Skaičiai šalia šakų nurodo Bootstrap vertes. *rrnA*, *rrnB* fitoplazmų 16S rDNR heterogeniškų operonų pavadinimai. Paryškintos – Lietuvoje aptiktos fitoplazmos. * – tyrimo metu aptiktų fitoplazmų pogrupis ir jų šeimaininkas.



3.12. pav.: Filogenetiniame medyje pavaizduotas identifikuotų rpI-A, rpI-B, rpI-C pogrupių fitoplazmų filogenetinis ryšys su kitais rpI grupės fitoplazmų atstovais palyginus ribosominių baltymų *rpl22/rps3* genų sekas. Medis sukonstruotas pagal 28 rpI grupės fitoplazmų ir 1 acholeplazmos (*Achleplasma laidlawii*) ribosominių baltymų *rpl22/rps3* genų sekas. Acholeplazma pasirinkta bendru protėviu. Priekyje nurodomas genų banko sekos numeris. Romėniški skaičiai nurodo fitoplazmų rp RFIP grupes, didžiosios raidės - pogrupius. Paryškintos – Lietuvoje aptiktos fitoplazmos. * – tyrimo metu aptiktų fitoplazmų pogrupis ir jų šeimininkas.



3.13. pav.: Filogenetiniame medyje pavaizduotas identifikuotų secY-I-C pogrupio fitoplazmų filogenetinis ryšys su kitais secY-I grupės fitoplazmų atstovais. Medis sukonstruotas pagal 21 16SrI grupės fitoplazmų ir 1 acholeplazmos (*Acholeplasma laidlawii*) *secY* genų sekas. Acholeplazma pasirinkta bendru protėviu. Priekyje nurodomas genų banko sekos numeris. Romėniški skaičiai nurodo fitoplazmų secY RFIP grupes, didžiosios raidės - pogrupius. * – tyrimo metu aptiktų fitoplazmų pogrupis ir jų šeimininkas.

3.5. 16SrIII pogrupio fitoplazmos

Tai žymiai rečiau Lietuvoje aptinkamos fitoplazmos. Tyrimo metu buvo aptikti 16SrIII grupės B, P ir naujas T pogrupiai. 16SrIII-B pogrupio fitoplazmos buvo aptiktos *A. ribauti* cikadelėje ir raudonajame dobile; 16SrIII-P – *Aphrodes* sp. ir *E. incisus* vabzdžiuose bei kiaulpienėje; 16SrIII-T - vyšnioje.

3.5.1. 16SrIII-B pogrupio fitoplazmos

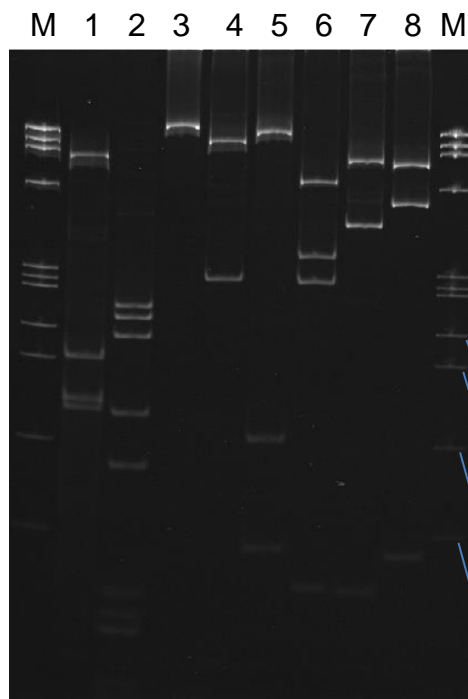
Vabzdžių ir raudonųjų dobilų (*T. pratense*) (3.14. pav.), su išreikštais filodijos, pageltimo, lapų susmulkėjimo simptomais, pavyzdžiai surinkti pievoje Kauno rajone.



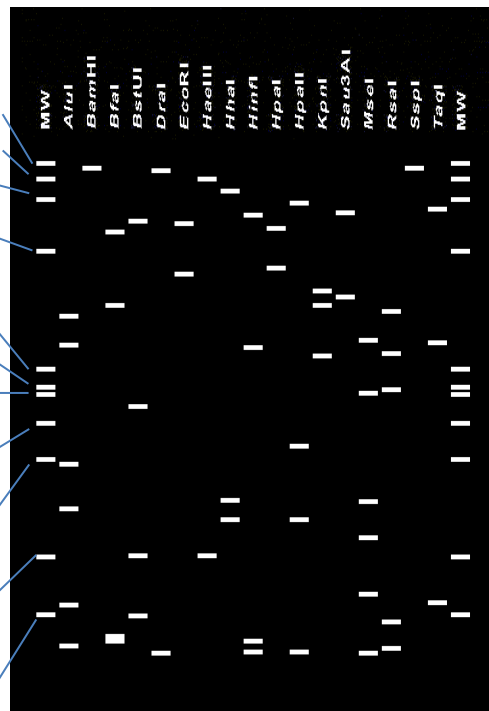
3.14. pav.: Raudonųjų dobilų infekuotų 16SrIII-B pogrupio fitoplazma simptomai: filodija, pageltimas.

Tyrimams buvo panaudota bendra DNR išskirta iš *A. ribauti* ir raudonųjų dobilų pavyzdžių. Gauti lizdinės PGR reakcijos metu su universaliais fitoplazmų pradmenimis 16S rDNR 1,2 kbp dydžio fragmentai buvo panaudoti RFIP analizėje. RFIP analizės profiliai (3.15. pav.) palyginti su klasifikacijos schemos profiliais. Profilių palyginimas atskleidė, kad aptikta fitoplazma

priklauso 16SrIII grupės B pogrupiui (pagal *HpaII* endonukleazės profilį). 16S rRNR geno fragmentas buvo klonuotas į *E. coli*. Atrinkti klonai nusiųsti



3.15. pav.: Fitoplazmos priskirtos 16SrIII-B pogrupiui 16S rRNR geno RFIP analizės profilis. 1-*AluI*, 2-*MseI*; 3-*KpnI*; 4-*HhaI*; 5-*HaeIII*; 6-*HpaII*; 7-*HinfI*; 8-*BfaI*; M- markeris (phiX174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) fragmentų dydžiai: 1353, 1078, 872, 692, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp).



3.16. pav.: 16SrIII-B pogrupio fitoplazmos 16S rRNR geno sekos CYEA1 (GenBank no. KC283217) virtualios RFIP analizės profilis sudarytas naudojant *iPhyClassifier* (Zhao et al., 2009). (MW- markeris phiX174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) fragmentų dydžiai: 1353, 1078, 872, 692, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp).

sekoskaitai. Gauta seka įkelta į genų banko duomenų bazę – jai suteiktas identifikacinis numeris: KC283217. Seka palyginta su NCBI duomenų bazėje esančiomis sekomis patvirtino, kad aptikta fitoplazma pagal sekų panašumą yra artimiausia 16SrIII grupės B pogrupio fitoplazmom. Naudojant *iPhyClassifier* internetinį įrankį nustatyta fitoplazmos klasifikacinė priklausomybė 16SrIII-B pogrupiui bei sudarytas virtualus RFIP analizės profilis (3.16. pav.).

Apibendrinimas: 16SrIII-B pogrupio fitoplazmos aptinkamos įvairiuose pasaulio regionuose žoliniuose ir sumedėjusiuose augaluose (Jomantienė et al.,

1998b; Lee et al., 1998; Seemuller et al., 1998; Postman et al., 2001; Montano et al., 2011).

Anksčiau Lietuvoje šios bakterijos buvo aptiktos raudonuosiuose dobiluose (*Trifolium pratense* L.) (Staniulis et al., 2000), sojose (*Glycine max* (L.) Merr.) ir gailiardijsuose (*Gaillardia pulchella* Foug.) (Jomantiene et al., 2000, 2002a).

Nustatėme, kad *A. ribauti* cikadelių pavyzdžiuose 16SrIII-B pogrupio fitoplazmos Lietuvoje ir pasaulyje aptiktos pirmą kartą, kas suteikia naujų duomenų apie šių vabzdžių gebėjimą pernešti įvairių grupių fitoplazmas.

A. ribauti galima priskirti galimiems 16SrIII-B pogrupio fitoplazmų pernešėjams mūsų regione. Ši rūšis galima 16SrIII-B pogrupio fitoplazmų platintoja tarp raudonųjų dobilų.

3.5.2. 16SrIII-P pogrupio fitoplazmos

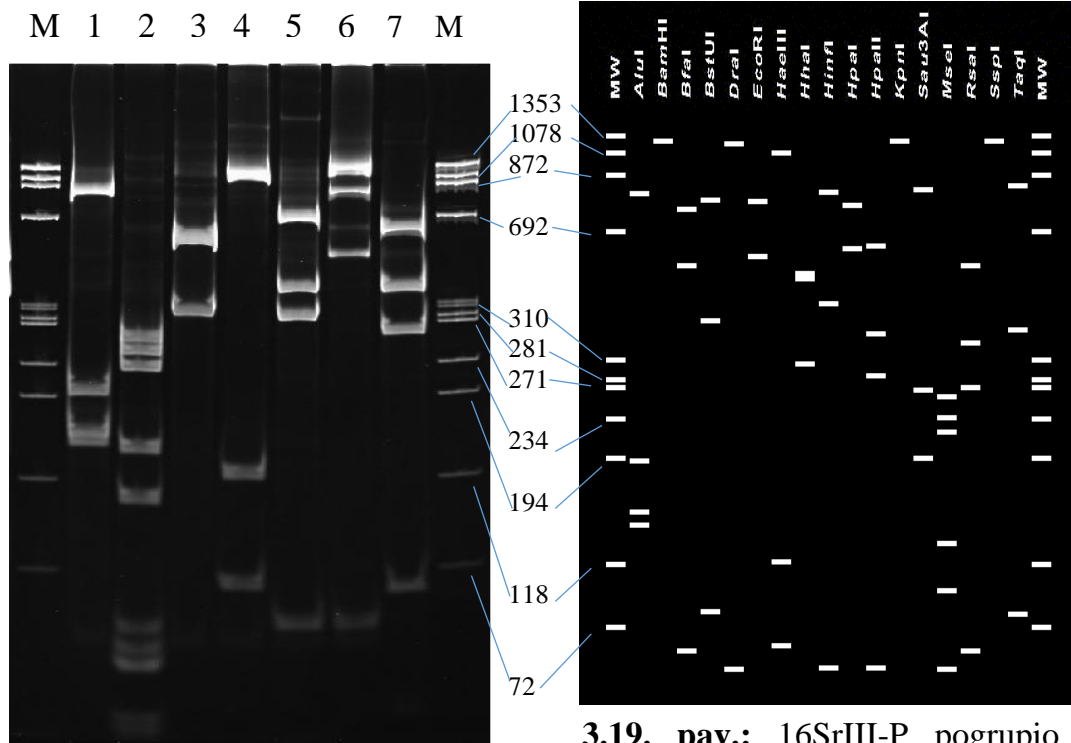
Tyrimo metu fitoplazmoms būdingas 1,2 kbp dydžio 16S rRNR geno fragmentas buvo gautas iš *Aphrodes* sp., *E. incisus* vabzdžių ir simptomatinės kiaulpienės (*T. officinale*) (3.17. pav.) pavyzdžių, surinktų Muniškėse (Kauno



3.17. pav.: A-B – Kiaulpienių (*Taraxacum officinale*) infekuotų 16SrIII-P pogrupio fitoplazma simptomai: žiedų pažaliavimas, lapų pageltimas, proliferacija.

r.). Palyginus šio fragmento RFIP analizės profilį (3.18. pav.) su klasifikacijos schemos profiliais, fitoplazma buvo priskirta 16SrIII-P pogrupiui. Nuo kitų

žinomų 16SrIII grupės fitoplazmų šis pogrupis skiriasi *HhaI* ir *HaeIII* endonukleazių RFIP profiliais (Lee et al., 1998; Jomantienė et al., 2002).



3.18. pav.: Fitoplazmos priskirtos 16SrIII-P pogrupiui 16S rRNR geno RFIP analizės profilis. 1-*AluI*; 2-*MseI*; 3-*HhaI*; 4-*HaeIII*; 5-*HpaII*; 6-*HinFI*; 7-*RsaI*; M-markeris (phiX174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) fragmentų dydžiai: 1353, 1078, 872, 692, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp).

3.19. pav.: 16SrIII-P pogrupio fitoplazmos 16S rRNR geno sekos DanVirA213 (GenBank no. KC283216) virtualios RFIP analizės profilis sudarytas naudojant *iPhyClassifier* (Zhao et al., 2009). Matomas tik vieno iš dviejų: *rrnA* operono sekos analizės profilis. (MW- markeris phiX174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) fragmentų dydžiai: 1353, 1078, 872, 692, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp).

16S rRNR geno fragmentai gauti iš *Aphrodes* sp. ir *E. incisus* pavyzdžių buvo klonuoti bei nusiųsti sekoskaitai. Gautos sekos palygintos su NCBI duomenų bazėje esančiomis sekomis. Taip pat sudarytas virtualaus gelio atvaizdas (3.19. pav.), naudojant *iPhyClassifier* internetinį įrankį. Šio pogrupio fitoplazmoms būdingas ribosominių operonų heterogeniškumas, todėl abi analizės atskleidė, kad klonuotas fragmentas priklauso - *rrnA* operonui.

Apibendrinimas: Šio pogrupio fitoplazmą pirmoji aptiko Jomantienė su bendradarbiais (2002a). Pagal žieduose sukeltą simptomą kiaulpienėse

aptiktai fitoplazmai buvo suteiktas DanVir (angl. – dandelion virescence) pavadinimas (Jomantienė et al., 2002a).

Mūsų tyrimo metu 16SrIII-P pogrupio fitoplazmos buvo aptiktos *Aphrodes* sp. ir *E. incisus* vabzdžių pavyzdžiuose. Iki šiol Lietuvoje ir pasaulyje galimi 16SrIII-P pogrupio fitoplazmų pernešėjai nebuvo žinomi, todėl galime šiuos vabzdžius priskirti prie potencialių šių bakterijų platintojų.

Aphrodes sp. vabzdžių pavyzdžiuose buvo aptiktos 16SrI-B, 16SrI-C, 16SrIII-P pogrupių fitoplazmos. Šie vabzdžiai žinomi kaip polifagai, todėl jų pernešamų fitoplazmų ir augalų ratas yra žymiai platesnis nei monofaginių rūšių. Dirbamuose laukuose svarbu kontroliuoti šių vabzdžių paplitimą ir skaičių, tam kad, sumažinti fitoplazminių infekcijų riziką ir poveikį.

E. incisus vabzdžių biologinės savybės (polifagai) ir stolburo fitoplazmos pernešimo gebėjimas (kituose regionuose) gali sukelti rimtą grėsmę Lietuvos žemės ūkiui, dėl klimato pokyčių sukulto patogenų geografinio paplitimo sričių poslinkio.

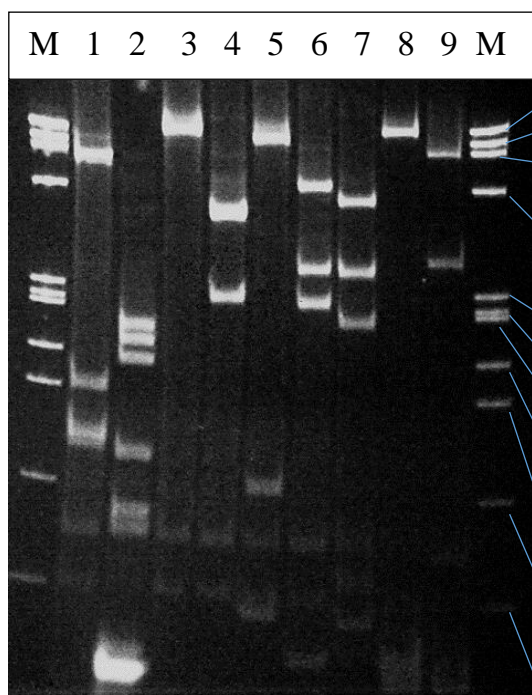
3.5.3. 16SrIII-T pogrupio fitoplazmos

Šio pogrupio fitoplazmos buvo aptiktos simptomatinių vyšnių (*Prunus cerasus*) (3.20. pav.) pavyzdžiuose, surinktuose Kauno rajono sode. Surinktuose vabzdžių pavyzdžiuose šio pogrupio fitoplazmų aptikti nepavyko.

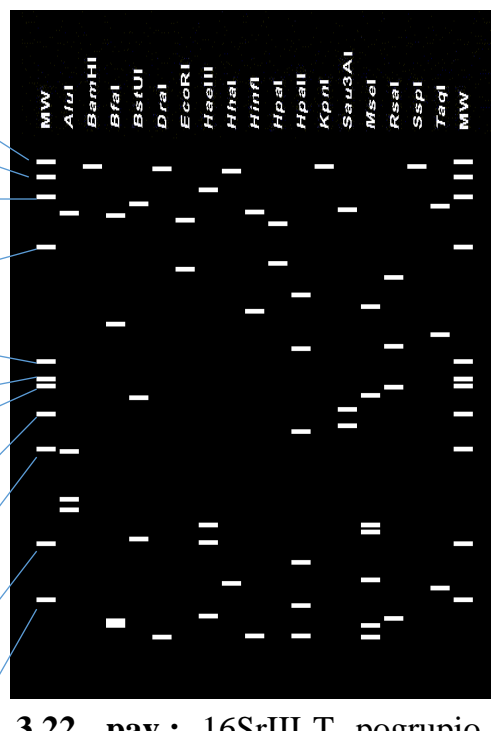
Bendra DNR gauta iš vyšnios pavyzdžių buvo panaudota lizdinėje PGR reakcijoje su P1A/16S-Sr (Lee et al., 2003; Lee et al., 2006) ir R16F2n/R16R2n (Lee et al., 2006) pradmenų porom. PGR reakcijos 1200 bp dydžio produktų profiliai agaroziniame gelyje patvirtino, kad augalai užsikrėtę fitoplazmomis. RFIP analizės profiliai bisakrilamidiniame gelyje (3.21. pav.) buvo palyginti su fitoplazmų klasifikacijos schemos RFIP profiliais (Lee et al., 1998; Marcone et al., 2001; Jomantienė et al., 2002a).



3.20. pav.: 16SrIII-T pogrupio fitoplazmų pažeistas augalas paprastoji vyšnia (*Prunus cerasus*). Simptomai: apmirimas, vėlyvas žydėjimas. Kauno r..



3.21. pav.: 16SrIII-T pogrupio fitoplazmos 16S rDNR RFIP analizės restrikcijų profiliai, kur DNR dydžio markeris Φ x174/*Hae*III fragmentų dydžiai: 1353, 1078, 872, 692, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp. 1-*Alu*I, 2-*Mse*I; 3-*Kpn*I; 4-*Hha*I; 5-*Hae*III; 6-*Hpa*II; 7-*Rsa*I; 8-*Hinf*I; 9-*Taq*I M-markeris



3.22. pav.: 16SrIII-T pogrupio fitoplazmos 16S rRNR geno sekos ChD (GenBank no. FJ231728) virtualios RFIP analizės profilis sudarytas naudojant *iPhyClassifier* (Zhao et al., 2009). (MW- markeris phiX174 DNA/*Bsu*RI (*Hae*III) fragmentų dydžiai: 1353, 1078, 872, 692, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp).

Fitoplazma aptikta vyšnios pavyzdžiuose priskirta visiškai naujam 16SrIII-T pogrupiui, nes neatitiko *HinfI* klasifikacijos schemos profilio. Aptiktos 16SrIII-T pogrupio fitoplazmos 16S rDNR genas buvo klonuotas. Atrinkti bei patikrinti klonai išsiųsti sekoskaitai. Gautos sekos palygintos su NCBI duomenų bazėje esančiomis sekomis bei panaudotos filogenetinėje analizėje bei filogenetinių medžių braižymui. *iPhyClassifier* įrankiu sudarytas virtualus RFIP atvaizdas (3.22. pav.). Analizių duomenys pavirtino, kad tiriamą fitoplazmą turėtų būti išskirta į atskirą fitoplazmų pogrupį. Tyrimo rezultatai kartu su bedraautorais aprašyti straipsnyje (Valiunas et al., 2009).

Apibendrinimas: Lietuvoje 16SrIII-T pogrupio fitoplazma vyšnioje aptikta pirmą kartą, kas praplečia 16SrIII grupės įvairovę Lietuvoje ir pasaulyje. Lietuvoje vyšniose dar aptikta 16SrI-Q pogrupio fitoplazma (Valiunas et al., 2009a). Fitoplazmos vyšniose aptiktos Vengrijoje (16SrX-B; 16SrI-B) ir kitur (Varga et al., 2001; Valiunas et al., 2009a).

Dar nežinoma, kas galėtų pernešti šias fitoplazmas Lietuvoje. Tikėtina, kad jas galėtų platinti mūsų tyrimo metu aptikti vabzdžiai pernešantys 16SrIII-P pogrupio fitoplazmas (*E. incisus*, *Aphrodes* sp.), dėl jų giminingumo tiriamom 16SrIII-T pogrupio fitoplazmom ir polifaginės vabzdžių prigimties.

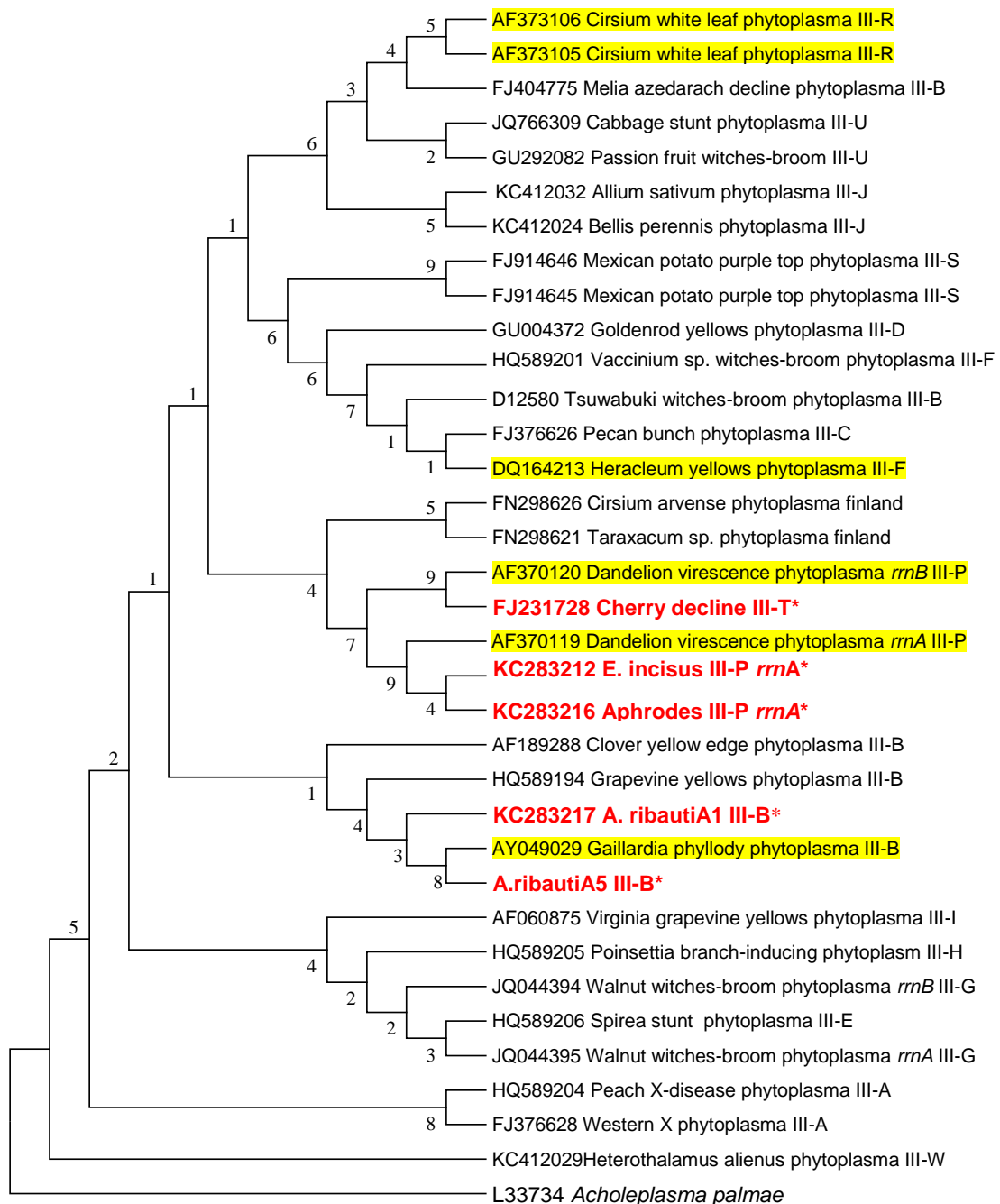
3.6. 16SrIII grupės fitoplazmų filogenetinis medis

16S rRNR geno filogenetinis medis (3.23. pav.) buvo sudarytas pagal 34 16SrIII grupės fitoplazmų, įskaitant gautas tyrimo metu ir 1 acholeplazmos (*Acholeplasma palmae*) 16S rDNR nukleotidines sekas. Jis rodo filogenetinius giminingumus tarp žinomų 16SrIII grupės fitoplazmų ir Lietuvoje aptiktų 16SrIII-B, 16SrIII-P ir naujo 16SrIII-T pogrupio fitoplazmų. Medžio šakojimosi tvarka patvirtina aptiktos fitoplazmos priskyrimą naujam 16SrIII-T pogrupiui. ChD fitoplazmos 16S rDNR parodė didelį giminingumą su dandelion virescence *rrnB* operono 16S rDNR seka, tai galėtų reikšti, kad abi

fitoplazmos priklauso tai pačiai rūšiai. Mūsų nagrinėjamoji fitoplazma yra labiausiai nutolusi nuo 16SrIII-A pogrupio western X-disease fitoplazmos.

Tyrimo metu *A. ribauti* vabzdžiuose aptikta 16SrIII-B pogrupio fitoplazma labiausiai gimininga anksčiau Lietuvoje aptiktai (Jomantienė et al., 2002) *gaillardia phyllody* fitoplazmai ir atsiskiria nuo kitų pasaulyje aptinkamų 16SrIII-B pogrupio fitoplazmų.

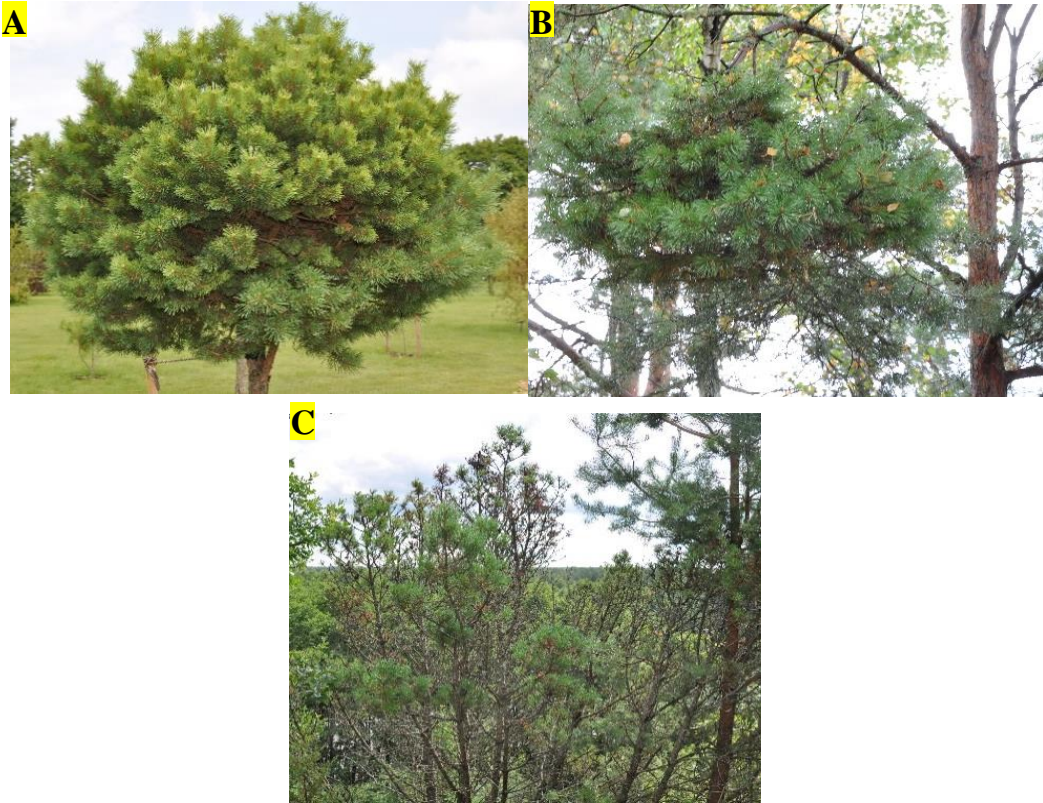
E. incisus ir *Aphrodes* sp. vabzdžiuose aptiktų fitoplazmų 16S rDNR sekos labiausiai giminingos dandelion virescence 16SrIII-P pogrupio fitoplazmų *rrnA* operono 16S rDNR sekai bei išsiskyrė į atskirą šaką nuo 16SrIII-P pogrupio fitoplazmų turinčių *rrnB* operoną.



3.23. pav.: Filogenetiniame medyje pavaizduotas identifikuotų 16SrIII-B, 16SrIII-P, 16SrIII-T pogrupių fitoplazmų filogenetinis ryšys su kitais 16SrIII grupės fitoplazmų atstovais. 16SrIII grupės fitoplazmų filogenetinis medis sukonstruotas pagal 34 16SrIII fitoplazmų grupių ir 1 acholeplazmos (*Acholeplasma palmae*) 16S rDNR. Acholeplazma pasirinkta bendru protėviu. Priekyje nurodomas genų banko sekos numeris. Romėniški skaičiai nurodo fitoplazmų 16S rDNR RFIP grupes, didžiosios raidės - pogrupius. Skaičiai šalia šakų nurodo Bootstrap vertes. *rrnA*, *rrnB* fitoplazmų 16S rDNR heterogeniškių operonų pavadinimai. Paryškintos – Lietuvoje aptiktos fitoplazmos. * – tyrimo metu aptiktų fitoplazmų pogrupis ir jų šeimininkas.

3.7. 16SrXXI-A pogrupo fitoplazmos

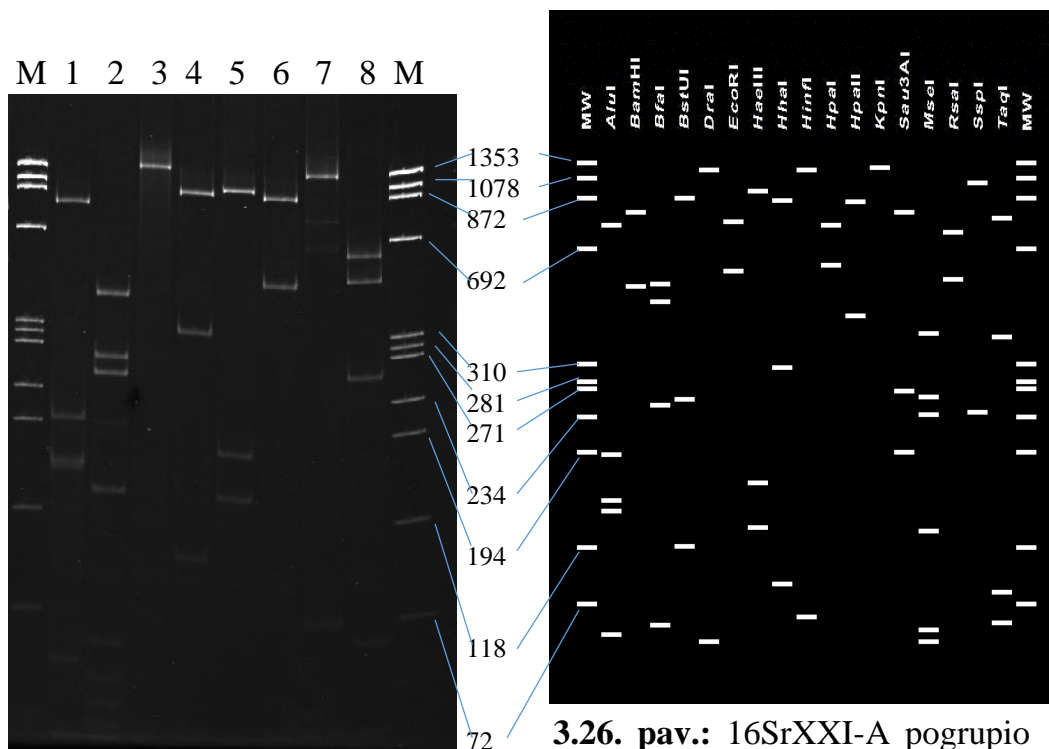
Tyrimams spyglių bei ūglių pavyzdžiai buvo surinkti nuo pušų (3.24. pav.) su išreikštais žemaūgės, spyglių sutrumpėjimo, pageltimo, raganų šluotų



3.24. pav.: A ir B - Pušų infekuotų 16SrXXI-A pogrupo fitoplazma simptomai: raganų šluota. **A**-Girionys, Kauno r.; **B**-Neringa.
C - Pušų infekuotų 16SrXXI-A pogrupo fitoplazmą simptomai: žemaūgė, spyglių sutrumpėjimas, apmirimas. Liškiava, Varėnos r.

simptomais iš trijų Lietuvos vietovių: Liškiavos apylinkių, Girionių ir Kuršių nerijos. Taip pat buvo surinkti vabzdžių pavyzdžiai, tačiau juose fitoplazmos nebuvo aptiktos. Išskirta bendra DNR buvo panaudota lizdinėje PGR reakcijoje su universaliais fitoplazmų pradmenimis. Gauti 1,2 kbp 16S rRNR geno fragmentai patvirtino fitoplazminę infekciją. Šių fragmentų RFIP analizės profiliai (3.25. pav.) buvo palyginti su fitoplazmų klasifikacijos schemas profiliais, iš kurių paaiškėjo, kad aptikta fitoplazma priklauso 16SrXXI-A pogrūpiui (pagal *Mse*I, *Hae*III endonukleazių profilius). 16S rDNR fragmentas buvo klonuotas bei nusiustas sekoskaitai. Gauta seka palyginta su NCBI

duomenų bazėje esančiomis sekomis bei sudarytas jos virtualios RFIP analizės



3.25. pav.: 16SrXXI-A fitoplazmą pogrupo RFIP analizės profilis. 1-*AluI*, 2-*MseI*; 3-*KpnI*; 4-*HhaI*; 5-*HaeIII*; 6-*HpaII*; 7-*HinfI*; 8-*BfaI*; M-markeris (phiX174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) fragmentų dydžiai: 1353, 1078, 872, 692, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp).

3.26. pav.: 16SrXXI-A pogrupo fitoplazmos 16S rRNR geno sekos PineBT (GenBank no. GU289676) virtualios RFIP analizės profilis sudarytas naudojant *iPhyClassifier* (Zhao et al., 2009). (MW- markeris phiX174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) fragmentų dydžiai: 1353, 1078, 872, 692, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp).

profilis (3.26. pav.) naudojantis *iPhyClassifier* įrankiu. Lietuvoje aptiktam kamienui suteiktas „pine bunchy top phytoplasma (PineBT)“ pavadinimas. Preliminarūs rezultatai pristatyti konferencijoje (Valiunas et al., 2010).

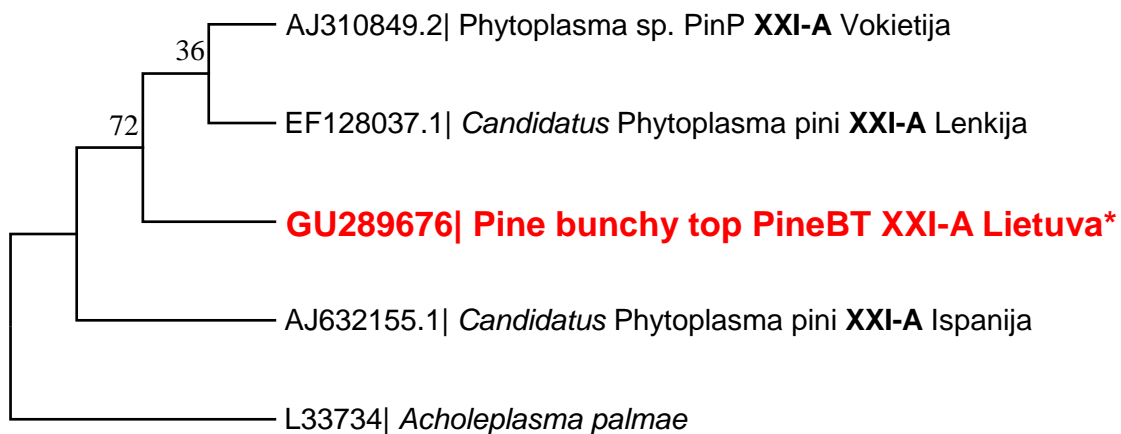
Apibendrinimas: 16SrXXI-A pogrupo fitoplazmos aptinkamos tik plikasėkliuose augaluose priklausančiuose pušinių (*Pinaceae*) šeimai: *Pinus halepensis*, *Pinus sylvestris*, *Abies procera*, *Picea pungens*, *Pinus banksiana*, *P. mugo*, *P. nigra*, *P. tabuliformis*, *Taxodium distichum* var. *imbricarium*, *Tsuga canadensis* (Schneider et al., 2005; Sliwa et al., 2008; Huang et al., 2011; Kaminska, Berniak, 2011; Kaminska et al., 2011).

Šio pogrupio fitoplazmos gali būti platinamos skiepijant, tačiau kas jas platina gamtoje dar nežinoma.

Medienos pramonė bei eksportas yra svarbios Lietuvos ekonomikai sritys, sukuriančios nemažai darbo vietų bei pelno, todėl svarbu išsiaiškinti šių patogenų paplitimo mastą, plitimo kelius bei poveikį miškų ekosistemoms.

3.8. 16SrXXI grupės filogenetinis medis

Filogenetinis medis (3.27. pav.) sudarytas panaudojus keturių fitoplazmų priklausančių 16SrXXI-A pogrupiui ir vienos acholeplazmos (*Acholeplasma palmae*) 16S rDNR sekas. Medžio šakojimosi pobūdis parodo, kad Lietuvoje aptikta fitoplazma daugiau gimininga Lenkijoje ir Vokietijoje aptiktiems kamienams nei Ispanijoje aptiktam kamienui.



3.27. pav.: Filogenetiniame medyje pavaizduotas identifikuotų 16SrXXI-A pogrupio fitoplazmų filogenetinis ryšys su kitais 16SrXXI grupės fitoplazmų atstovais palyginus 16S rDNR genų sekas. Medis sukonstruotas pagal 4 16SrXXI grupės fitoplazmų ir 1 acholeplazmos (*Acholeplasma palmae*) 16S rDNR genų sekas. Acholeplazma pasirinkta bendru protėviu. Priekyje nurodomas genų banko sekos numeris. Romėniški skaičiai nurodo fitoplazmų 16Sr RFIP grupes, didžiosios raidės - pogrupius. Skaičiai šalia šakų nurodo Bootstrap vertes. * – tyrimo metu aptikta fitoplazma.

3.9. Apibendrinimas

Tyrimo metu buvo aptiktos 16SrI-A, B, C; 16SrIII-B, P, T ir 16SrXXI-A pogrupių fitoplazmos. 16SrXXI-A pogrupio fitoplazma Lietuvoje, o 16SrIII-T pogrupio fitoplazma Lietuvoje ir pasaulyje aptiktos pirmą kartą.

Fitoplazmos buvo aptiktos bei identifikuotos vabzdžių pavyzdžiuose priklausančiuose dešimčiai rūšių bei vienai neidentifikuotai rūšiai, priklausančiai *Aphrodes* genčiai (3.3. lentelė). Nustatytos dvi naujos galimos

3.3. lentelė: Vabzdžių rūšys ir juose aptiktos fitoplazmos.

Vabzdžių rūšis/gentis	Viso/infekuotų vabzdžių	Identifikuoto fitoplazmų kamieno 16Sr pogrupis	Aptiktų fitoplazmų 16S rRNR geno sekų GenBank nr.	Kamienas*/GenBank palyginamojo kamieno numeris
<i>Anaceratagallia ribauti</i>	6/4	16SrIII-B	KC283217	CYE /AF173558
		16SrI-C	N	CPh/L33762
<i>Aphrodes</i> sp.	6/6	16SrIII-P	KC283216	DanVir/AF3 70119
		16SrI-B	KC283215	AY1/L33767 CPh/L33762
		16SrI-C	N	
<i>Aphrophora alni</i>	1/1	16SrI-B	N	AY1/L33767
<i>Arthaldeus striifrons</i>	4/4	16SrI-C	N	CPh/L33762

<i>Cacopsylla mali</i>	10/8	16SrI-B	N	AY1/L33767
<i>Cicadella viridis</i>	3/3	16SrI-B	N	AY1/L33767
<i>Euscelis incisus</i>	10/10	16SrI-C	KC283211	CPh/L33762
			KC283213	DanVir/AF3
		16SrIII-P	KC283212	70119
<i>Lepyronia coleoptrata</i>	5/5	16SrI-B	N	AY1/L33767
				CPh/L33762
		16SrI-C	N	
<i>Macrosteles sexnotatus</i>	10/3	16SrI-C	KC283214	CPh/L33762
<i>Philaenus spumarius</i>	5/4	16SrI-B	N	AY1/L33767
				CPh/L33762
		16SrI-C	KC283218	
<i>Stenocranus minutus</i>	5/3	16SrI-A	N	BB/AF22206
				4

Kamienas* – Aptikto fitoplazmų 16Sr pogrupio palyginamasis kamienas

Paryškintas – Pernešimo bandymais patvirtintas fitoplazmų vektorius

CYE-clover yellow edge, AY1-Maryland aster yellows, DanVir-dandelion virescence, CPh-clover phyllody.

N - Nėra

vabzdžių pernešėjų rūšys (*A. striifrons*, *S. minutus*). Pirmą kartą mūsų regione 16SrI-A, -B, -C; 16SrIII-B, -P pogrupių fitoplazmos buvo identifikuotos: *A. alni*, *A. ribauti*, *Aphrodes* sp., *A. striifrons*, *C. mali*, *C. viridis*, *L. coleoptrata*, *M. sexnotatus*, *P. spumarius* ir *S. minutus* vabzdžiuose. Tai papildė žinias apie šių fitoplazmų pernešėjų ir šeimininkų įvairovę.

Surinktuose augalų pavyzdžiuose fitoplazmos buvo aptiktos aštuoniolikoje augalų rūšių (3.4. lentelė). Penkiose augalų rūšyse (eglė,

3.4. lentelė: Augalų rūšys ir jose aptiktos fitoplazmos

Nr.	Augalo rūšis	Fitoplazmų 16Sr pogrupis	Vietovė
1.	<i>Centaurea erythraea</i>	16SrI-B	Muniškiai, Kauno r.
2.	<i>Cirsium arvense</i>	16SrI-C	Muniškiai, Kauno r.
3.	<i>Dactylis glomerata</i>	16SrI-B	Muniškiai, Kauno r.
4.	<i>Fragaria x anannassa</i>	16SrI-A	Dvarčionys, Vilniaus m. sav.
5.	<i>Malus domestica</i>	16SrI-B	Muniškiai, Kauno r., Žiežmariai, Kiašiadorių r.
6.	<i>Picea abies</i>	16SrI-A	Girionys, Kauno r.
7.	<i>Picris hieracioides</i>	16SrI-B	Muniškiai, Kauno r.
8.	<i>Pinus sylvestris</i>	16SrXXI-A	Girionys, Liškiava
9.	<i>Prunus avium</i>	16SrI-B	Muniškiai, Kauno r.
10.	<i>Prunus domestica</i>	16SrI-B	Muniškiai, Kauno r.
11.	<i>Prunus cerasifera</i>	16SrI-B; 16SrI-C	Muniškiai, Žiežmariai
12.	<i>Prunus cerasus</i>	16SrI-B; 16SrIII-T	Kauno r.
13.	<i>Ribes nigrum</i>	16SrI-B	Vilniaus r.
14.	<i>Scorzonera hispanica</i>	16SrI-B	Tamošava, Trakų r.
15.	<i>Stellaria media</i>	16SrI-B	Vilniaus r.
16.	<i>Taraxacum officinale</i>	16SrIII-P	Muniškiai, Kauno r.
17.	<i>Trifolium pratense</i>	16SrI-B	Muniškiai, Kauno r.
18.	<i>Trifolium repens</i>	16SrI-C	Muniškiai, Kauno r.

gelteklė, pušis, širdažolė, žliugė) fitoplazmos aptiktos pirmą kartą Lietuvoje.

Filogenetinė fitoplazmų genų sekų analizė ir sukonstruoti medžiai patvirtino aptiktų fitoplazmų priskyrimą 16SrI-A, B, C; 16SrIII-B, P, T ir

16SrXXI-A pogrupiams bei parodė jų giminingumą su Lietuvoje bei pasaulyje aptiktom fitoplazmom.

Tarptautinėje Genų banko duomenų bazėje deponuotos 8 fitoplazmų kamienų 16S rRNR nukleotidines sekos, gautos iš fitoplazmų aptiktų vabzdžių ir geltligėmis pažeistų augalų pavyzdžių.

4. IŠVADOS

1. Tyrimo metu apibūdintos 35 *Hemiptera* būrio vabzdžių rūšys (aštuonios iki genties lygio). Nustatyta, kad 11 vabzdžių rūšių buvo infekuota fitoplazmomis, priklausančiomis septyniems fitoplazmų 16Sr pogrupiams. Identifikuotų rūšių vabzdžiai yra potencialūs šių pogrupių fitoplazmų pernešėjai Lietuvoje. Penkiose augalų rūšyse fitoplazmos aptiktos pirmą kartą Lietuvoje. Šios rūšys yra nauji fitoplazmų augalai šeimininkai.
2. Atlikus fitoplazmų aptiktų vabzdžių ir augalų pavyzdžiuose 16S rRNR, *rp* ir *secY* genų sekų analizę, nustatyta, kad aptiktos fitoplazmos priklauso 16SrI-A, B, C, 16SrIII-B, P, T ir 16SrXXI-A fitoplazmų pogrupiams. 16SrIII-T pogrupio fitoplazma Lietuvoje ir pasaulyje aptikta pirmą kartą.
3. Nustatyta, kad dvi aptiktos vabzdžių rūšys (*Arthaldeus striifrons*, *Stenocranus minutus*) yra nauji galimi fitoplazmų vektoriai Lietuvoje ir pasaulyje. Duomenys atskleidė, kad identifikuotos 8 vabzdžių rūšys gali turėti platesnę pernešamų fitoplazmų įvairovę. Mūsų duomenys praplečia aptiktų fitoplazmų šeimininkų įvairovę bei galimų vektorių ratą ne tik Lietuvoje, bet ir pasaulyje.
4. Eksperimentiniais tyrimais patvirtinta, kad *E. incisus* rūšies vabzdžiai platina 16SrI-C pogrupio fitoplazmas baltuosiuose dobiluose (*Trifolium repens*).
5. Filogenetinė aptiktų fitoplazmų genų sekų analizė parodė, kad tiriamos fitoplazmos labiausiai giminingos Lietuvoje jau anksčiau aptiktiems fitoplazmų kamienams.
6. Filogenetinė analizė parodė, kad 16SrIII-T pogrupio fitoplazmos 16S rRNR geno sekos fragmentas labiausiai giminingas 16SrIII-P pogrupio fitoplazmos *rrnB* operono sekai, tai galėtų reikšti, kad abi fitoplazmos priklauso tai pačiai rūšiai.

7. Tyrimų duomenys patvirtina, kad medienos sultimis mintantys vabzdžiai, gali įgyti fitoplazmas, todėl yra tikimybė, kad jie gali būti ne tik jų šeimininkai, bet ir pernešėjai.

5. LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Alma, A., Daffonchio, D., Gonella, E., Raddadi, N. 2010. Microbial Symbionts of *Auchenorrhyncha* transmitting phytoplasmas: a resource for symbiotic control of phytoplasmoses. In: *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors* (eds Weintraub P.G. and Jones P.). Wallingford: CAB International 272–292.
- Almintaitė, A., Valiunas, D., Navalinskiene, M., Staniulis, J., Jomantiene, R. 2001. *Hiacinthus orientalis* is the host for a new phytoplasma, exhibiting ribosomal interoperon sequence heterogeneity. *Biologija* 4: 37-39.
- Arocha, Y., López, M., Piñol, B., Fernández, M., Picornell, B., Almeida, R., Palenzuela I., Wilson M., R., Jones P. 2005. '*Candidatus* Phytoplasma graminis' and '*Candidatus* Phytoplasma caricae', two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 2451-2463.
- Arocha, Y., Zerfy, T., Abebe, G., Proud, J., Hanson, J., Wilson, M., Jones, P., Lucas, J. 2009. Identification of potential vectors and alternative plant hosts for the phytoplasma associated with napier grass stunt disease in Ethiopia. *Journal of Phytopathology* 157: 126–132.
- Bai, X., Correa, V. R., Toruño, T. Y., Ammar, el-D., Kamoun, S., Hogenhout, S. A. 2009. AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei. *Molecular Plant Microbe Interactions* 22(1): 18-30.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S. A., Jancso Radek, A., Shevchenko, D. V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J. W., Hogenhout, S. A. 2006. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology* 188(10): 3682-3696.
- Barbara, D. J., Morton, A., Clark, M. F., Davies, D. L. 2002. Immunodominant membrane proteins from two phytoplasmas in the aster yellows clade

- (chlorante aster yellows and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region. *Microbiology* 148: 157-167.
- Baric, S.; Öttl, S.; Dalla Via J. 2010. Infection rates of natural psyllid populations with ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ in South Tyrol (Northern Italy). 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. *Julius-Kühn-Archiv*, 427.
- Batlle, A., Martínez, M. A., Laviña, A. 2000. Occurrence, distribution and epidemiology of Grapevine Yellows in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 106: 811–816.
- Berg, M., Seemuller, E. 1999. Chromosomal organization and nucleotide sequence of the genes coding for the elongation factors G and Tu of the apple proliferation phytoplasma. *Gene* 226: 103–109.
- Bertaccini, A. 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12: 673-689.
- Bertaccini, A., Duduk, B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopatologia Mediterranea* 48: 355-378.
- Bos, L. 1957. Heksenbezemverschijnselen, een pathologisch-morfologisch onderzoek (Witches' broom phenomena, a patho-morphological study). *Mededelingen van de Landbouwhogeschool te Wageningen/Nederland*. 57 (1): 1–79.
- Bosco, D., D’Amelio, R. 2010. Transmission specificity and competition of multiple phytoplasmas in the insect vector. In: *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors* (eds. Weintraub P.G. and Jones P.), 293-308.
- Bosco, D., Leoncini, P., Saracco, P., Racciah, B., Marzachi, C. 2007. Interrelationships between ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ and its leafhopper vectors (*Homoptera: Cicadellidae*). *Journal of Economic Entomology* 100: 1504–1511.
- Bove, J. M., Garnier, M. 2002. Phloem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. *Plant science* 164: 423-438.
- Brčák, J. 1979. Leafhopper and planthopper vectors of plant disease agents in central and southern Europe. In K. F. Harris, K. Maramorsh (Ed.),

- Leafhopper vectors and plant disease agents (pp. 97-153). New York: Academic Press.
- Bressan, A., Turata, R., Naixner, M., Spiazzi, S., Boudon-Padieu, E. Girolami, V. 2007. Vector activity of *Hyalesthes obsoletus* living on nettles and transmitting a stolbur phytoplasma to grapevines: a case study. *Annals of Applied Biology* 150: 331–339.
- Březíková, M., Linhartová, Š. 2007. First report of potato stolbur phytoplasma in hemipterans in Southern Moravia. *Plant Protection Science* 43(2): 73–76.
- Cainelli, C., Forno, F., Mattedi, L., Grando, M. S. 2007. Can apple aphids be vectors of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ IOPC/WBRS Bulletin 30(4): 261–266.
- Caudwell, A., 1966. Inhibition of fl avescence doree virus *in vivo* by means of heat treatment. *Annales des Epiphyties* 17: 61–66.
- Choi, Y. H., Tapias, E. C., Kim, H. K., Lefeber, A. W. M., Erkelens, C., Verhoeven, J. Th. J., Brzin, J., Zel, J., Verpoorte, R. 2004. Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using ¹HNMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Plant Physiology* 135: 2398–410.
- Crews, L. J., Mccully, E. M., Canny, J. M., Huang, X. C., Ling, E. C. L. 1998. Xylem feeding by spittlebug nymphs: some observations by optical and cryo-scanning electron microscopy. *American Journal of Botany* 85(4): 449-460.
- Curkovic Perica, M. 2008. Auxin-treatment induces recover of phytoplasma-infected periwinkle. *Journal of Applied Microbiology* 105: 1826–1834.
- Dakhil, H. A., Abou-Fakhr, H. E., El-Mohtar, C., Abou-Jawdah, Y. 2011. Survey of leafhopper species in almond orchards infected with almond witches’-broom phytoplasma in Lebanon. *Journal of Insect Science* 11(60).

- Davis, M. J., Kramer, J. B., Ferwerda, F. H., Brunner, B. R. 1996. Association of a bacterium and not a phytoplasma with papaya bunchy top disease. *Phytopathology* 86: 102-109.
- Davis, R. E., Dally, E. L. 2001. Molecular identification of a phytoplasma associated with witches'-broom disease of black raspberry in Oregon and its classification in group 16SrIII, new subgroup Q. *Plant Disease* 85: 1121.
- Davis, R. E., Jomantiene, R., Zhao, Y., Dally, E. L. 2003. Folate biosynthesis pseudogenes, $\Psi folP$ and $\Psi folK$, and an O-sialoglycoprotein endopeptidase gene homolog in the phytoplasma genome. *Dna And Cell Biology* 22(11): 697-706.
- Davis, R. E., Lee, I. M. 2000. Phytoplasma. In.:*Encyclopedia of Microbiology*. Second edition. Academic Press 3: 640-646.
- Davis, R. E., Lee, I.-M. 1982. Pathogenicity of spiroplasmas, mycoplasma-like organisms, and vascular-limited fastidious walled bacteria. *Phytopathogenic Prokaryotes* 1: 491-513.
- Davis, R. E., Whitcomb, R. F., Steere, R. L. 1968. Remission of aster yellows disease by antibiotics. *Science* 161: 793-794.
- Davis, R. E., Worley, J. F., 1973: Spiroplasma: motile, helical microorganism associated with corn stunt disease. *Phytopathology* 63: 403-408.
- Davis, R. E., Zhao, Y., Dally, E. L., Lee, I.-M., Jomantiene, R. Douglas, S. M. 2013. '*Candidatus* Phytoplasma pruni', a novel taxon associated with X-disease of stone fruits, *Prunus* spp.: multilocus characterization based on 16S rRNA, secY, and ribosomal protein genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 766-776.
- Deeley, J., Stevens, W. A., Fox, R. T. V. 1979. Use of Dienes' Stain to detect plant diseases induced by MLOs. *Phytopathology* 69: 1169-1171.
- Doi, Y. M., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H. 1967. Mycoplasma or PLT-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or

- paulownia witches` broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 33: 259-266.
- Drobnjaković, T., Perić, P., Marčić, D., Picciau, L., Alma, A., Mitrović, J., Duduk, B., Bertaccini, A. 2011. Leafhoppers and cixiids in phytoplasma-infected carrot fields: species composition and potential phytoplasma vectors. *Pesticides and Phytomedicine* 25(4): 311-318.
- Duduk, B., Perić, P., Marčić, D., Drobnjaković, T., Picciau, L., Alma, A., Bertaccini A. 2008. Phytoplasmas in carrots: disease and potential vectors in Serbia. *Bulletin of Insectology* 61(2): 327-331.
- Elder, R. J., Milne, J. R., Reid, D. J., Guthrie, J. N., Persley, D. M. 2002. Temporal incidence of three phytoplasma-associated diseases of *Carica papaya* and their potential hemipteran vectors in central and south-east Queensland. *Australasian Plant Pathology* 31: 165–176.
- Firrao, G., Gibb, K., Streten, C. 2005. Short taxonomic guide to the genus '*Candidatus Phytoplasma*'. *Journal of Plant Pathology* 87(4): 249-263.
- Firrao, G., Gobbi, E., Locci, R. 1993. Use of polymerase reaction to produce oligonucleotide probes for mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 602-607.
- Fletcher, J., Wayadande, A., Melcher, U., Ye, F. 1998. The phytopathogenic mollicute–insect vector interface: a closer look. *Phytopathology* 88: 1351–1358.
- Font, I., Abad, P., Albinana, M., Espino, A. I., Dally, E. L., Davis R. E., Jorda C. 1999. Amarillos y enrojecimientos en zanahoria: una enfermedad a diagnóstico. *Bol. San. Veg. Plagas* 25:405–1525.
- Fos, A., Danet, J. L., Zreik, L., Garnier, M., Bove, M., J. 1992. Use of monoclonal antibody to detect the stolbur mycoplasma-like organisms in plants and insects and to identify a vector in France. *Plant Disease* 76(11): 1092-1096.
- Galetto, L., Bosco, D., Marzachi, C. 2008. Amp-mediated interactions between '*Candidatus Phytoplasma asteris*' chrysanthemum yellows (CY) and leafhopper vectors. In: Porta-Puglia, A. and Gonthier, P. (eds)

- Proceedings of the 9th International Congress of Plant Pathology. Journal of Plant Pathology 90(2, Suppl.): 461.
- Galetto, L., Nardi, M., Saracco, P., Bressan, A., Marzachi, C. and Bosco, D. 2009. Variation in vector competency depends on chrysanthemum yellows phytoplasma distribution within *Euscelidius variegatus*. Entomologia Experimentalis et Applicata 131:200–207.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., Lilburn, T. G. 2001. Taxonomic outline of the procaryotic genera, Bergey's manual of systematic bacteriology, Second edition, Release 1.0, USA.
- Gasparich, G. E. 2009. Spiroplasmas and phytoplasmas: Microbes associated with plant hosts. Biologicals 38(2010): 193-203.
- Genyte, L. P. 1975. Zoblepanya klevera tipa zeltuchy v Litovskoy SSR i obosnovanye mer borby s nimi. Disertacya na soiskaniye uchenoi stepeni kandidata biologicheskikh nauk, Vilnius.
- Genyte, L., Staniulis, J. 1975a. Distribution and transmission of clover yellows type disease, caused by mycoplasma-like organisms and biology of their agents 2. Effects of antibiotics of tetracycline group. Lietuvos TSR Mokslų akademijos darbai C serija 1(69):3-11.
- Genyte, L., Staniulis, J. 1975b. Yellows type diseases of clover associated with mycoplasmalike organisms, and their transmission by *Aphrodes bicinctus*. In: Virological Investigations in the Far East. Virusologicheskie Issledovanija na Dalnem Vostoke Trudy Biologo-Pochyennogo Instituta 28(131):165-170.
- Genyte, L., Staniulis, J. 1976. Rearing of leafhopper *Aphrodes bicinctus* Schrank species under laboratory conditions. Lietuvos TSR Mokslų akademijos darbai C serija 4(76): 65-69.
- Girsova, N. V., Bottner, K. D., Kastalyeva, T. B., Mozhaeva, K. A., Owens, R. A., Lee, I-M. 2008. Identification of phytoplasma species associated with potato diseases in Russia. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences 73(2): 331-3.

- Gundersen D. E., Lee I.-M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35: 114-151.
- Gundersen, D. E., Lee, I.-M., Rehner, S. A., Davis, R. E., Kingsbury, D. T. 1994. Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *Journal of Bacteriology* 176(17): 5244-5254.
- Han S. S., 2012. Transmission of mulberry dwarf phytoplasma by a *Balclutha punctata*. *Journal of Korean Forestry Society* 101(4): 635-639.
- Ho, K. C., Tsai, C. C., Chung, T. L., 2001. Organization of ribosomal RNR genes from a Loofah witches'-broom phytoplasma. *DNA Cell Biology* 20(2): 115.
- Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R., Harrison, N., Dickinson, M. 2008. Phytoplasma phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of 'Candidatus Phytoplasma'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1826–1837.
- Hodgetts, J., Dickinson, M. 2010. Phytoplasma Phylogeny and Detection Based on Genes other than 16S rRNA. In: *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors* (eds Weintraub P.G. and Jones P.). Wallingford: CAB International 93-113.
- Hogenhout, S. A., Oshima, K., Ammar, el-D., Kakizawa, S., Kingdom, H. N., Namba, S. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology* 9(4):403-23.
- Hoshi, A., Oshima, K., Kakizawa, S., Ishii, Y., Ozeki, J., Hashimoto, M., Komatsu, K., Kagiwada, S., Yamaji, Y., Namba, S. 2009. A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(15): 6416-6421.
- Huang, S., Tiwari, A. K., Rao, G. P. 2011. 'Candidatus Phytoplasma pini' affecting *Taxodium distichum* var. *imbricarium* in China. *Phytopathogenic Mollicutes* 1(2): 91-94.

- Hunt, R. E., Parr J. C., Haynes K. F. 1993. Influence of leafhopper (*Homoptera: Cicadellidae*) gender and female mating status on plant disease dynamics within a simple habitat. *Environmental Entomology* 22: 109–15.
- IRPCM, 2004. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1243-1255.
- Irwin, M. E., Nault, L. R., Godoy, C., Kampmeier, G. E. 2000. Diversity and movement patterns of leaf beetles (*Coleoptera: Chrysomelidae*) and leafhoppers (*Homoptera: Cicadellidae*) in a heterogeneous tropical landscape. Implications for redressing the integrated pest management paradigm. In *Interchanges of Insects*, (ed. Ekbom B., Irwin M., Robert Y.), pp. 141–68. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academy.
- Ivanauskas A., Valiunas D., Jomantiene R., Staniulis J., Alma A., Picciau L., Davis R. E. 2011. First report of potential phytoplasma vectors *Euscelis incisus* and *Macrosteles sexnotatus* in Lithuania. *Bulletin of Insectology*, 64: S131-132.
- Jagoueix-Eveillard, S. Tarendeau, F., Guolter, K., Danet, J.-L., Bove, J. M., Garnier, M. 2001. *Catharanthus roseus* genes regulated differentially by mollicute infections. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14(2): 225-233.
- Jiang, Y. P., Chen, T. A. 1987. Purification of mycoplasma-like organisms from lettuce with aster yellows disease. *Phytopathology* 77(6):949-953.
- Jomantiene R., Davis R. E. 2007. Repeated conserved sequences as genetic markers for phytoplasma detection. *Bulletin of Insectology* 60(2):259-260.
- Jomantiene, R., Davis, R. E. 2006. Clusters of diverse genes existing as multiple, sequence-variable mosaics in a phytoplasma genome. *FEMS Microbiology Letters* 255: 59–65.

- Jomantiènė, R., Davis, R. E., Antoniuk, L., Staniulis, J. 2000. First report of phytoplasmas in soybean, alfalfa, and *Lupinus* sp. in Lithuania. *Plant Diseases* 84: 198.
- Jomantiene, R., Davis, R. E., Valiunas, D., Alminaitė, A. 2002a. New group 16SrIII phytoplasma lineages in Lithuania exhibit rRNA interoperon sequence heterogeneity. *European Journal of Plant Pathology*, 108(6): 507-517.
- Jomantiene, R., Davis, R. E., Valiunas, D., Jasinskaitė, R., 2002b: First report of oat (*Avena sativa* L.) as host of a phytoplasma belonging to group 16SrI, subgroup A. *Plant Diseases* 86: 443.
- Jomantiene, R., Davis, R., E., Maas, J., Dally, E., L. 1998. Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene operon sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 269-277.
- Jomantiene, R., Davis, R.E., Lee, I.-M., Zhao, Y., Bottner-Parker, K., Valiunas, D., Petkauskaite, R. 2010. Onion is host for two phytoplasma lineages, subgroups 16SrI-A and 16SrI-(B/L)L, in Lithuania: a *Hinf*I site revealed a snp marking divergent branches of evolution. *Journal of Plant Pathology* 92 (2): 461-470.
- Jomantiene, R., Zhao, Y., Davis, R. E. 2007. Sequence-variable mosaics: Composites of recurrent transposition characterizing the genomes of phylogenetically diverse phytoplasmas. *DNA Cell Biology* 26: 557–564.
- Kakizawa, S., Oshima, K., Jung, H-Y., Suzuki, S., Nishigawa, H., Arashida, R., Miyata, S-I., Ugaki, M., Kishino, H., Namba, S. 2006b. Positive selection acting on a surface membrane protein of the plant-pathogenic phytoplasmas. *Journal of Bacteriology* 188(9): 3424-3428.
- Kakizawa, S., Oshima, K., Namba, S., 2006a. Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. *Trends in Microbiology* 14(6): 254-256.

- Kamińska, M., Berniak, H. 2011. Detection and identification of three 'Candidatus Phytoplasma' species in *Picea* spp. trees in Poland. *Journal of Phytopathology* 159:796–798.
- Kaminska, M., Berniak, H., Obdrzalek, J. 2011. New natural host plants of 'Candidatus Phytoplasma pini' in Poland and the Czech Republic. *Plant Pathology* 60: 1023-1029.
- Kaminska, M., Silwa, H. 2003. Effect of antibiotics on the symptoms of stunting disease of *Magnolia liliiflora* plants. *Journal of Phytopathology* 151: 59–63.
- Kater, M. M., Dreni, L., Colombo, L. 2006. Functional conservation of MADS-box factors controlling floral organ identity in rice and *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 57(13): 3433–3444.
- Khadhair, A., H., Evans, I., R., Choban, B. 2002. Identification of aster yellows phytoplasma in garlic and green onion by PCR-based methods. *Microbiological Research* 157: 161-167.
- Khadhair, A.-H., Hiruki, C. 1995. The molecular genetic relatedness of willow witches'-broom phytoplasma to the clover proliferation group. *Proceedings of the Japan Academy* 71: 145-147.
- Kirkpatrick, B. C. 1991. Mycoplasma-like organisms: plant and invertebrate pathogens. In *The prokaryotes*, 2nd edition, pp. 4050-4067. Edited by: A. Ballows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schliefer. New York: Springer-Verlag Press.
- Kollar, A., Seemüller, E. 1989. Base composition of the DNA of mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases. *Journal of Phytopathology* 127: 177-86.
- Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdoll, A., M., Reinhardt, R., Seemüller E.,. 2008. The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma 'Candidatus Phytoplasma mali'. *BMC Genomics* 9:306.
- Kunkel, L. O. 1926. Studies on aster yellows. *American Journal of Botany* 13: 646-705.

- Kunz, G., Roschatt, C., Schweigkofler, W. 2010. Biodiversity of planthoppers (*Auchenorrhyncha*) in vineyards infected by Bois noir phytoplasma. *Gredleriana* 10: 89-108.
- Kuske, C. R., Kirkpatrick, B. C. 1992. Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasma-like organisms and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42: 226-233.
- Landi, F., Prandini, A., Paltrinieri, S., Mori, N., Bertaccini, A. 2007. Detection of different types of phytoplasmas in stone fruit orchards in northern Italy. *Bulletin of Insectology* 60 (2): 163-164.
- Lee, I. M., Bottner, K. D., Secor, G., Rivera-Varas, V. 2006. '*Candidatus* Phytoplasma americanum', a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56(7): 1593-1597.
- Lee, I.-M., Bottner, K. D., Munyaneza, J. E., Davis, R. E., Crosslin, J. M., du Toit, L. J., Crosby, T. 2006. Carrot purple leaf: a new spiroplasmal disease associated with carrots in Washington State. *Plant disease* 90(8): 989-993.
- Lee, I.-M., Davis, R. E., Gundersen-Rindal, D. E. 2000: Phytoplasma: Phytopathogenic *Mollicutes*. *Annual Review of Microbiology* 54: 221-255.
- Lee, I.-M., Dawn, E., Gundersen-Rindal, D., Bertaccini, A. 1998. Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 88(12): 1359-1366.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., Bartoszyk, I. 1998a. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1153-1169.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., Bottner, K. D., Marccone, C., Seemüller, E. 2004. '*Candidatus* Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases.

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54(4): 1037-1048.
- Lee, I.-M., Martini, M., Bottner, K. D., Dane, R. A., Black, M. C., Troxclair, N. 2003. Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology* 93: 1368-1377.
- Lee, I.-M., Zhao, Y., Bottner, K. D. 2006. *SecY* gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Molecular and Cellular Probes* 20: 87–91.
- Lefol, C, Lherminier, J, Boudon-Padieu, E, Larrue, J, Louis, C, Caudwell, A. 1994 Propagation of flavescence dorée MLO (mycoplasma-like organism) in the leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kbm. *Journal of Invertebrate Pathology* 63: 285-293.
- Lefol, C., Caudwell, A., Lherminier, J., Larrue, J. 1993. Attachment of the Flavescence dor´ee pathogen (MLO) to leafhopper vectors and other insects. *Annals of Applied Biology* 123: 611–22.
- Levy, Y. Y., Dean, C. 1998. The transition to flowering. *Plant Cell* 10(12): 1973–1990.
- Lim, P., O., Sears, B., B. 1991. DNA sequence of the ribosomal protein genes *rp12* and *rps19* from a plant-pathogenic mycoplasma-like organism. *FEMS Microbiology Letters* 84: 71-74.
- MacLean, A. M., Sugio, A., Makarova, O. V., Findlay, K. C., Grieve, V. M., Toth, R., Nicolaisen, M., Hogenhout, S., A. 2011. Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* 157: 831–841.
- Maixner, M. 2006. Temporal behavior of grapevines infected by type II of Vergilbungskrankheit (bois noir). In: Extended Abstracts 15th Meeting of the International Council for Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine, Stellenbosch, South Africa, pp. 223–224.

- Maixner, M. 2007. Biology of *Hyalesthes obsoletus* and approaches to control this soilborne vector of bois noir disease. IOBC/WPRS Bulletin 30(7): 3–9.
- Mayer, C., J., Vilcinskas, A., Gross, J. 2008. Pathogen-induced release of plant allomone manipulates vector insect behavior. Journal of Chemical Ecology 34: 1518-1522.
- Makutenaite-Navalinskiene, M., K. 1981: Virusnye i mikoplazmennyje bolezni cvetočnykh rastenij. „Mokslas“, Vilnius.
- Malinowski, T., Zandarski, J., Komorowska, B., Zawadzka, B. 1996: Application of dapi staining and PCR amplification of DNA for the identification of pear decline phytoplasma in declining trees in Poland. Phytopatologia Polonica 12: 103-110.
- Mannini, F. 2007. Hot water treatment and field coverage of mother plant vineyards to prevent propagation material from phytoplasma infections. Bulletin of Insectology 60: 311–312.
- Maramorosch, K. 1952. Direct evidence of the multiplication of aster-yellows virus in its insect vector. Phytopathology 42: 59-64.
- Maramorosch, K. 1957. Reversal of virus-caused stunting in plants by gibberellic acid. Science 126(3275): 651-652.
- Maramorosch, K., 1958. Viruses that infect and multiply in both plants and insects. Transactions New York Academy Sciences (Serie II) 20: 383-395.
- Maramorsch, K. 2011. Historical reminiscences of phytoplasma discovery. Bulletin of Insectology 64(Supplement):S5-S8.
- Marcone, C. 2012. Phytoplasmas: colonizing agents of plant phloem and insects. Phytopathogenic Mollicutes 2(2): 37-46.
- Marcone, C., Lee, I.-M., Davis, R.E., Ragozzino, A. and Seemuller, E. 2000. Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and *tuf* gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50: 1703–1713.

- Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U., Seemüller, E., 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89(9): 805-810.
- Marcone, C., Seemüller, E. 2001. A chromosome map of the European stone fruit yellows phytoplasma. *Microbiology* 147: 1213-1221.
- Martini, M., Lee, I.-M., Bottner, K. D., Zhao, Y., Botti, S., Bertaccini, A., Harrison, N. A., Carraro L., Marcone, C., J. Khan, A., Osler, R. 2007. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2037-2051.
- Martini, M., Marcone, C., Mitrovic, J., Maixner, M., Delic, D., Myrta, A., Ermacora, P., Bertaccini, A., Duduk, B. 2012. ‘*Candidatus* Phytoplasma convolvuli’, a new phytoplasma taxon associated with bindweed yellows in four European countries. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 2910–2915.
- Matteoni, J. A., Sinclair, W. A. 1988. Elm yellows and ash yellows. In: *Tree Mycoplasmas and Mycoplasma Diseases*. (eds. Hiruki C.), p. 19–31.
- Mazzoni, V., Cosci, F., Lucchi, A., Santini, L. 2001. Leafhoppers and planthoppers vectors in Ligurian and Tuscan vineyards. *Integrated Control in Viticulture. IOBC-WPRS Bulletins* 24 (7): 263 – 266.
- McCoy, R. E. 1982. Antibiotic treatment for control of tree diseases associated with mycoplasma-like organism. *Reviews of Infectious Diseases* 4: 157–161.
- McCoy, R. E., Caudwell, A., Chang, C. J., Chen, T. A., Chiykowski, L. N., Cousin, M. T., Dale J. L., de Leeuw, G. T. N., Golino, D. A., Hackett, K. J., Kirkpatrick, B. C., Marwitz, R., Petzold, H., Sinha, R. C., Sugiura, M., Whitcomb, R. F., Yang Y. L., Zhu, B. M., Seemüller, E. 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: Whitcomb R. F., Tully J. G. (eds.). *The Mycoplasmas*, vol. V., pp. 545-640. Academic Press, San Diego.

- McCoy, R. E., Williams, D. S. 1982. Chemical treatment for control of plant mycoplasma diseases. pp. 152-173. In Daniels M.J. and Williams D.S. (eds.), *Plant Insect Mycoplasma Techniques*. London, Croom Helm.
- Mitrović, J., Kakizawa, S., Duduk, B., Oshima, K., Namba, S. Bertaccini, A. 2011. The *groEL* gene as an additional marker for finer differentiation of 'Candidatus *Phytoplasma asteris*'-related strains. *Annals of Applied Biology* 159: 41–48.
- Montano, H. G., Cunha, J. O., Pimentel, J. P. 2011. Phytoplasmas in Brazil: an update. *Bulletin of Insectology* 64: S251-S252.
- Mori, N., Pavan, F., Bondavalli, R., Reggiani, N., Paltrinieri, S., Bertaccini, A. 2008. Factors affecting the spread of 'Bois Noir' disease in north Italy vineyards. *Vitis* 47: 65–72.
- Murrall, D. J., Nault, L. R., Hoy, C., W., Madden, L. V., Miller, S. A. 1996. Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (*Homoptera: Cicadellidae*). *J. Econ. Entomol.* 89: 1223–32
- Musil, M., Mišiga, S. 1961. Investigations on european yellows-type viruses. *Phytopathologische Zeitschrift* 42: 1-38.
- Nicholls, C. I., Parrella, M, Altieri, M. A. 2001. The effects of a vegetational corridor on the abundance and dispersal of insect biodiversity within a northern California organic vineyard. *Landscape Ecology* 16: 133–148.
- Nickel, H., Remane, R. 2002. Artenliste der Zikaden Deutschlands, mit Angabe von Nährpflanzen, Nahrungsbreite, Lebenszyklus, Areal und Gefährdung (*Hemiptera, Fulgoromorpha et Cicadomorpha*). *Beiträge zur Zikadenkunde* 5: 27-64.
- Nielson, M. W. 1968. The leafhopper vectors of phytopathogenic viruses (*Homoptera, Cicadellidae*) taxonomy, biology and virus transmission. U.S. Agricultural Research Service Technical Bulletin, 1382(1968): 1–386.
- Okuda, S 1972. Occurrence of diseases caused by mycoplasma-like organisms in Japan. *Plant Protection* 26: 180–183.

- Orságová, H., Březíková, M., Schlesingerová, G. 2011. Presence of phytoplasmas in hemipterans in Czech vineyards. *Bulletin of Insectology*, 64: S119-S120.
- Oshima, K., Ishii, Y., Kakizawa, S., Sugawara, K., Neriya, Y., Misako Himeno, Minato, N., Miura, C., Shiraishi, T., Yamaji, Y., Namba S. 2011. Dramatic Transcriptional Changes in an Intracellular Parasite Enable Host Switching between Plant and Insect. *PLoS ONE* 6(8): e23242.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H-Y., Wei W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M., Namba S. 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics* 36(1): 27-29.
- Osler, R., Carraro, L., Ermacora, P., Ferrini, F., Loi, N. Loschi, A., Martini, M., Mutton, P.B. and Refatti, E. 2003. Roguing: a controversial practice to eradicate grape yellows caused by phytoplasmas. 14th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of Grapevine (ICVG), Locorotondo, Italy, p. 68.
- Ossiannilsson, F. 1978. The Auchenorrhyncha (*Homoptera*) of Fennoscandia and Denmark, Part 1: Introduction, infraorder *Fulgoromorpha*. Scandinavian Science Press LTD, Klampenborg, Denmark.
- Ossiannilsson, F. 1981. The Auchenorrhyncha (*Homoptera*) of Fennoscandia and Denmark, Part 2: The Families *Cicadidae*, *Cercopidae*, *Membracidae*, and *Cicadellidae* (excl. *Deltocephalinae*). Scandinavian Science Press LTD, Klampenborg, Denmark.
- Ossiannilsson, F. 1983. The Auchenorrhyncha (*Homoptera*) of Fennoscandia and Denmark, Part 3: The Family Cicadellidae. Scandinavian Science Press LTD, Copenhagen, Denmark.
- Padovan, A. C., Gibb, K. S., Bertaccini, A., Vibio, M., Bonfiglioli, R. E., Magarey, P. A., Sears, B. B. 1995. Molecular detection of the Australian grapevine yellows phytoplasma and comparison with grapevine yellows

- phytoplasmas from Italy. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1: 25-31.
- Palermo, S., Arzone, A., Bosco, D. 2001. Vector-pathogen-host plant relationships of chrysanthemum yellows (CY) phytoplasma and the vector leafhoppers *Macrostelus quadripunctulatus* and *Euscelidius variegatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 99: 347–354.
- Pantoja, A., Hagerty, M. A., Emmert, Y. S., Munyaneza, E. J. 2009. Leafhoppers (*Homoptera: Cicadellidae*) associated with potatoes in Alaska: species composition, seasonal abundance, and potential phytoplasma vectors. *American Journal of Potato Research* 86:68-75.
- Pilkington, L. J., Gurr, G. M., Fletcher, M. J., Elliott, E., Nikandrow, A., Nicol, H. I. 2004. Reducing the immigration of suspected leafhopper vectors and severity of Australian lucerne yellows disease. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44: 983–992.
- Power, A. G. 1992. Host plant dispersion, leafhopper movement and disease transmission. *Ecological Entomology* 17: 63–68.
- Purcell, A. H. 2008. Transmission of *Xylella fastidiosa* bacteria by xylem-feeding insects. In: Capinera L. J. (ed.), *Encyclopedia of entomology* 2nd Edition, p. 3885-3886.
- Puterka, G. J., Reinke, M., Luvisi, D., Ciomperlik, M. A., Bartels, D., Wendel, L., Glenn, D. M. 2003. Particle film, surround WP, effects on glassy-winged sharpshooter behavior and its utility as a barrier to sharpshooter infestations in grapes. *Plant Health Progress Online*, doi:10.1094/PHP-2003-0321-RS.
- Quaglino, F., Zhao, Y., Casati, P., Bulgari, D., Bianco, P. A., Wei, W. Davis, R. E. 2013. ‘*Candidatus* *Phytoplasma solani*’, a novel taxon associated with stolbur- and bois noir-related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 2879–2894.
- Riedle-Bauer, M., Sára, A., Regner, F. 2008. Transmission of a stolbur phytoplasma by the Agalliinae leafhopper *Anaceratagallia ribauti*

- (*Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cicadellidae*). *Journal of Phytopathology* 156: 687-90.
- Riedle-Bauer, M., Tiefenbrunner, W., Otrba, J., Hanak, K., Schildberger, B., Regner, F. 2006. Epidemiological observations on Bois Noir in Austrian vineyards. *Mitteilungen Klosterneuburg* 56: 177-181.
- Roingard, P. 2008. Viral detection by electron microscopy: past, present and future. *Biological Cell* 100: 491–501.
- Romanazzi, G., Murolo, S. 2008. Partial uprooting and pulling to induce recovery in bois noir-infected grapevines. *Journal of Phytopathology* 156: 747–750.
- Rosa, C., McCarthy, E., Duong, K., Hoover, G., Moorman, G. 2014. First report of the spittlebug *Lepyronia quadrangularis* and the leafhopper *Latalus* sp. as vectors of the Elm Yellows associated phytoplasma, *Candidatus Phytoplasma ulmi* in North America. *Plant disease* 98(1): 154.
- Saha, P., Dasgupta, I., Das, S., 2006.- A novel approach for developing resistance in rice against phloem limited viruses by antagonizing the phloem feeding hemipteran vectors. *Plant Molecular Biology* 62(4-5): 735-752.
- Samuitienė, M., Jomantienė, R., Valiūnas, D., Navalinskienė, M., Davis, R. E. 2007. Phytoplasma strains detected in ornamental plants in Lithuania. *Bulletin of Insectology* 60 (2): 137-138.
- Samuitienė, M., Navalinskienė, M., Jomantienė, R., Davis, R. E., 2002. Molecular detection and characterisation of phytoplasma infecting daisy (*Bellis perennis* L.) plants in Lithuania. *Botanica Lithuanica* 8(2): 195-200.
- Schneider, B., Gibb, K.S., Seemuller, E. 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143: 3381–3389.
- Schneider, B., Torres, E., Martín, M. P., Schröder, M., Behnke, H. D., Seemüller, E. 2005. ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’, a novel taxon from

- Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55: 303-307.
- Schvester, D., Carle, P., Moutous, G. 1963. Transmission de la flavescence dorée de la vigne par *Scaphoideus littoralis* Ball. (Homopt., Jassidae). Experiences de 1961. Annales des Epiphyties 14, 175–198.
- Seemüller, E. 1990. Apple proliferation. In: Jones A. L., Aldwinckle H. S. (ed.), Compendium of Apple and Pear Diseases 67-68.
- Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., Göshl, M., 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. Journal of Plant Pathology 80: 3-26.
- Sinclair, W. A. 2000. Elm yellows in North America. In: Dunn C. P. (ed.), The Elms Breeding, Conservation, and Disease Management, p. 121-136.
- Sinclair, W.A., Iuli, R. J., Dyer, A. T., Larsen, A. O. 1989. Sampling and histological procedures for diagnosis of ash yellows. Plant diseases 73: 432-435.
- Sliwa, H., Kaminska, M., Korszun, S., Adler, P. 2008. Detection of 'Candidatus Phytoplasma pini' in *Pinus sylvestris* trees in Poland. Journal of Phytopathology 156(2): 88-92.
- Smart, C. D., Sears, B. B., Kirkpatrick, B. C. 1994. Analysis of evolutionary relationships between MLOs and other members of the class *Mollicutes* based on 16/23 S rRNA intergenic sequences. IOM Letters 3: 269-70.
- Söderman, G., Gillerfors, G., Endrestöl, A. 2009. An annotated catalogue of the *Auchenorrhyncha* of Northern Europe (*Insecta*, *Hemiptera: Fulgoromorpha et Cicadomorpha*). Cicadina 10: 33-69.
- Staniulis, J. 1980. Mycoplasma-like organisms, detected in weeds with yellows diseases in the Lithuania. Lietuvos TSR Mokslu Akademijos Darbai, C ser. 2(90): 3-10.
- Staniulis, J. 1988. Augalų gelta ir jos sukėlėjai. „Mokslas“, Vilnius.
- Staniulis, J., Davis, R. E., Jomantiene, R., Kalvelyte, A., Dally, E. L. 2000. Single and mixed phytoplasma infections in phyllody and dwarf-diseased clover plants in Lithuania. Plant Disease 84: 1061-1066.

- Staniulis, J., Genyte, G. 1974. Distribution, transmission and biology of clover yellows type disease caused by mycoplasma organisms. I. Mycoplasma-like organisms discovered in association with dwarfing and chlorosis of leaves. *Lietuvos TSR Mokslu Akademijos Darbai, C ser.* 1(65):3-9.
- Staniulis, J., Genyte, L. 1976. Mycoplasma-like organisms associated with *Cirsium*, *Matricaria* and *Plantago* yellows as a possible source of clover yellows type diseases. *Journal of Phytopathology* 86:240–245.
- Staniulis, J., Sutkute E., A. 1979. Mycoplasma-like organisms associated with yellows of vegetable crops in Lithuania. *Lietuvos TSR Mokslu Akademijos Darbai, C ser.* 2(86): 57-63.
- Stark-Urnau, M., Kast, W., K. 2008. Maßnahmen zur Eindämmung des Brennesseltyps der Schwarzholzkrankheit bei Weinreben (*Vitis vinifera*). *Gesunde Pflanzen* 60: 85–89.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., Métraux, J. P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35: 235-270.
- Streten, C., Gibb, K. S. 2005. Genetic variation in ‘*Candidatus Phytoplasma australiense*’. *Plant Pathology* 54: 8–14.
- Sugio, A., Kingdom, H. N., MacLean, A. M., Grieve, V. M., Hogenhout, S. A. 2011. Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 108: 1254–1263.
- Summers, C. G., Stapleton, J. J. 2002. Management of corn leafhopper (*Homoptera: Cicadellidae*) and corn stunt disease in sweet corn using reflective mulch. *Journal of Economic Entomology* 95: 325–330.
- Suzuki, S., Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Jung, H., Yamaji, Y., Nishigawa, H., Ugaki, M. Namba, S. 2006. Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103: 4252–4257.

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Todd, J. L., Harris, M. O., Nault, L. R. 1990. Importance of color stimuli in host-finding by *Dalbulus* leafhoppers. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 54: 245–50.
- Tonkyn, D. W., Whitcomb, R. F. 1987. Feeding strategies and the guild concept among vascular feeding insects and microorganisms. In: Harris, K. F. (ed.) *Current Topics in Vector Research*, vol. 4. Springer-Verlag, New York, pp. 179–200.
- Toth, K. F., Harrison, N. A., Sears, B. B. 1994. Phylogenetic relationships among members of the class *Mollicutes* deduced from *rps3* gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 119-124.
- Tran-Nguyen, L., T., T., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R., Gibb, K., S. 2008. Comparative genome analysis of „Candidatus Phytoplasma australiense“ (subgroup tuf – Australia I; rp-A) and „Ca. P. asteris“ strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology* 190(11):3979-3991..
- Tscharntke, T., Brandl, R. 2004. Plant insect interactions in fragmented landscapes. *Annual Review of Entomology* 49: 405–430.
- Urbanavicienė, L., Jomantiene, R., Davis, R. E., 2005. First report of barley as host of a phytoplasma belonging to group 16SrI, subgroup B, and ribosomal protein subgroup rpI-B in Lithuania. *Plant Diseases* 89: 339.
- Urbanaviciene, L., Jomantiene, R., Valiunas, D., Davis, E. R. 2007. Molecular identification of 16SrI-A, 16SrI-B, 16SrI-C, and 16SrI-L subgroups of phytoplasmas in gramineous plants in Lithuania. *Bulletin of Insectology* 60(2): 127-128.
- Urbanavičienė, L., Valiunas, D. 2006a. Identification of aster yellows group (subgroup 16SrI-C) phytoplasma in *Festuca arundinacea* based on PCR and RFLP methods. *Botanica Lithuanica* 12(2): 121–125.

- Urbanavičienė, L., Valiunas, D., Jomantienė, R. 2006b. Detection of aster yellows group (subgroup 16SrI-B) phytoplasma in oats based on nested PCR and RFLP in Lithuania. *Agronomy Research* 4(Special issue), 417–420.
- Valenta, V. 1958. The problem of stolbur and related yellows type virus diseases in Czechoslovakia. *Agronomski Glasnik* 8: 87-102.
- Valiunas, D, Jomantiene, R, Davis, R. E. 2013. Evaluation of the DNA-dependent RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*) for phytoplasma classification and phylogeny. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63(10): 3904-3914.
- Valiūnas, D., 2003. Lietuvoje paplitusių fitoplazmų identifikavimas ir jų įvairovės bei molekulinė evoliucinių ryšių įvertinimas. Botanikos institutas, fitovirusų laboratorija, biomedicinos mokslai, biologija 01 B, daktaro disertacija, Vilnius.
- Valiunas, D., Alminaite, A., Jomantiene, R., Davis, R. E., Maas J. L. 2004. Possible cause of European blueberry disease is related to North American milkweed yellows phytoplasma. *Journal of Plant Pathology* 86: 135-140.
- Valiunas, D., Alminaite, A., Staniulis, J., Jomantiene, R., Davis, R. E. 2001a. First report of alder yellows phytoplasma in the Eastern Baltic Region. *Plant Diseases* 85: 1120.
- Valiunas, D., Alminaite, A., Staniulis, J., Jomantiene, R., Davis, R. E., 2001b. First report of aster yellows-related subgroup I-A phytoplasma strains in carrot, phlox, sea lavender, aconitum, and hyacinth in Lithuania. *Plant Diseases* 85: 804.
- Valiunas, D., Jomantiene, R., Davis, R. E. 2009a. Establishment of a new phytoplasma subgroup, 16SrI-Q, to accommodate a previously undescribed phytoplasma found in diseased cherry in Lithuania. *Journal of Plant Pathology* 91(1): 71-75.
- Valiunas, D., Jomantiene, R., Davis, R. E., Sindaraviciene, I., Alminaite, A., Staniulis, J. 2000. Molecular detection and characterization of

- phytoplasmas infecting vegetables, legumes, and ornamental plants in Lithuania. Transactions Estonian Agricultural University 209: 220-223.
- Valiunas, D., Jomantiene, R., Ivanauskas, A., Sneideris, D., Staniulis, J., Davis, R. E. 2010. A possible threat to the timber industry: ‘*Candidatus* Phytoplasma pini’ in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Lithuania, p. 38. In: Current status and perspectives of phytoplasma disease research and management (Bertaccini A., Lavina A., Torres E., Eds).-Sitges, Spain, February 1-2.
- Valiunas, D., Staniulis, J., Davis, R. E. 2006. ‘*Candidatus* Phytoplasma fragariae’, a novel phytoplasma taxon discovered in yellows diseased strawberry, *Fragaria x ananassa*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56: 277-281.
- Valiunas, D., Urbanavičienė, L., Jomantiene, R., Davis, R. E. 2007. Molecular detection, classification and phylogenetic analysis of subgroup 16SrI-C phytoplasmas detected in diseased *Poa* and *Festuca* in Lithuania Biologija 53(2): 36–39.
- Van der Want, J. P. H., Dijkstra, J. 2006. A history of plant virology. Archives of Virology 151: 1467-1498.
- Varga, K., Kölber, M., Nemeth, M., Ember, I., Erdos, Z., Biro, E., Paltrinieri, S., Martini, M., Bertaccini, A. 2001. Identification of phytoplasmas infecting sour cherry in Hungary. Acta Horticulturae 550: 383-388.
- Vega, F. E., Davis, R. E., Barbosa, P., Dally, E. L., Purcell, A. H., Lee, I. M. 1993. Detection of a plant pathogen in a non-vector insect species by the polymerase chain reaction. Phytopathology 83: 621–624.
- Verdin, E., Salar, P., Danet, J-L., Choueiri, E., Jreijiri, F., Zammar, S. E., Gélie, B., Bové, J. M., Garnier, M. 2003. ‘*Candidatus* Phytoplasma phoenicium’ sp. nov., a novel phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53: 833-838.
- Wayadande, A. C. 1994. Electronic monitoring of leafhoppers and planthoppers: feeding behavior and application in host-plant resistance

- studies. In: (Ellsbury, M. M., Backus, E. A. and Ullman, D. L. (eds)) History, development, and application of AC electronic insect feeding monitors. Thomas Say Publications in Entomology, Entomological Society of America, Lanham, Maryland, pp. 86–105.
- Wang, M. Q., Maramorosch, K. 1998. Earliest historical record of a tree mycoplasma disease: beneficial effect of mycoplasma-like organisms on peonies. In: Mycoplasma diseases of crops: basic and applied aspects (Maramorosch, K., Raychaudhuri, S. P., Eds) pp. 349-356. Springer Verlag, New York, USA.
- Wang, Q. C., Valkonen, J. P. T. 2008. Efficient elimination of sweetpotato little leaf phytoplasma from sweetpotato by cryotherapy of shoot tips. *Plant Pathology* 57: 338–347.
- Wei W., Davis R., E., Nuss D., L., Zhao Y. 2013. Phytoplasmal infection derails genetically preprogrammed meristem fate and alters plant architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(47): 19149-19154.
- Wei, W., Cai, H., Jiang, Y., Lee, I.-M., Davis, R. E., Ding, Y., Yuan, E., Chen, H. & Zhao, Y. 2011. A new phytoplasma associated with little leaf disease in azalea: multilocus sequence characterization reveals a distinct lineage within the aster yellows phytoplasma group. *Annals of Applied Biology* 158: 318–330.
- Wei, W., Davis, R., E., Lee, I-M., Zhao, Y. 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57(8):1855-1867.
- Weintraub P. G. 2007. Insect vectors of phytoplasmas and their control – an update. *Bulletin of Insectology* 60(2): 169-173.
- Weintraub, P. G., Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasma. *Annual Review of Entomology* 51: 91-111.

- Weintraub, P. G., Wilson, R. M. 2010. Control of phytoplasma diseases and vectors. In: *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors* (Eds Weintraub P.G. and Jones P.). Wallingford: CAB International. 233-249.
- Zahavi, T., Peles, S., Harari, A.R., Soroker, V., Sharon, R. 2007. Push and pull strategy to reduce *Hyalesthes obsoletus* population in vineyards by *Vitex agnus-castus* as trap plant. *Bulletin of Insectology* 60(2): 297–298.
- Zaitlin, M., Palukaitis, P. 2000. Advances in understanding plant viruses and virus diseases. *Annual Review of Phytopathology* 38: 117-143.
- Zhao, Y., Sun, Q., Wei, W., Davis, R. E., Wu, W., Liu, Q. 2009a. ‘*Candidatus* Phytoplasma tamaricis’, a novel taxon discovered in witches’-broom-diseased salt cedar (*Tamarix chinensis* Lour.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 2496–2504.
- Zhao, Y., Wei, W., Lee, I-M., Shao, J., Suo, X., Davis, R. E. 2009. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, *iPhyClassifier*, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59(10): 2582-2593.

6. PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Tarptautiniuose mokslo leidiniuose (leidiniuose, referuojamuose Thomson Reuters Web of Knowledge duomenų bazėje ir turinčiuose citavimo indeksą (Journal Citation Reports):

1. Valiunas D., Jomantiene R., **Ivanauskas A.**, Abraitis R., Staniene G., Zhao Y., Davis R. E., 2009: First report of a new phytoplasma subgroup, 16SrIII-T, associated with decline disease affecting sweet and sour cherry trees in Lithuania. *Plant Disease*, 93(5): 550.
2. Jomantiene R., Valiunas D., **Ivanauskas A.**, Urbanaviciene L., Staniulis J., Davis R. E. 2011: Larch is a new host for a group 16SrI, subgroup B phytoplasma in Ukraine. *Bulletin of Insectology* 64(S): S101-S102.
3. **Ivanauskas A.**, Valiunas D., Jomantiene R., Staniulis J., Alma A., Picciau L., Davis R. E. 2011: First report of potential phytoplasma vectors: *Euscelis incisus* and *Macrosteles sexnotatus* in Lithuania. - *Bulletin of Insectology* 64(S): S131-S132.
4. **Ivanauskas A.**, Valiunas D., Jomantiene R., Picciau L., Davis R. E. 2014. Possible insect vectors of ‘Candidatus Phytoplasma asteris’ and ‘Candidatus Phytoplasma pruni’-related strains in Lithuania. *Zemdirbyste-Agriculture* 101(3). Priimtas spausdinimui.

Konferencijos, pranešimai

1. Valiunas D., Jomantiene R., **Ivanauskas A.**, Sneideris D., Staniulis J., R.E. Davis. 2010: A possible threat to the timber industry: ‘Candidatus Phytoplasma pini’ in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Lithuania. Abstract book of the combined meeting of Work Groups 1-4, COST Action FA0807, Editors A. Bertaccini, A. Lavifia, E. Torres, Current status and perspectives of phytoplasma disease research and management, Sitges, Spain, February 1th and 2nd, 2010.

2. Jomantiene R., Valiunas D., **Ivanauskas A.**, Urbanaviciene L., Staniulis J., Davis R. E. 2011: Larch is a new host for a group 16SrI, subgroup B phytoplasma in Ukraine. *Second International Phytoplasma Working Group Meeting*. Neustadt/Weinstrasse, Germany, 12-16 September 2011.
3. **Ivanauskas A.**, Valiunas D., Jomantiene R., Staniulis J., Alma A., Picciau L., Davis R. E. 2011: First report of potential phytoplasma vectors: *Euscelis incisus* and *Macrosteles sexnotatus* in Lithuania. - *Second International Phytoplasma Working Group Meeting*. Neustadt/Weinstrasse, Germany, 12-16 September 2011. http://www.ipwgnet.org/index.php?option=com_content&view=article&id=38&Itemid=33
4. **Ivanauskas A.** 2013. Lietuvoje aptinkamos fitoplazmos ir jų vabzdžiai pernešėjai. Jaunųjų mokslininkų konferencija BIOATEITIS: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos. Vilnius. 2013-12-11.

Mokslo populiarinimo straipsniai

1. Indrė Urbonaitė, Deividas Valiūnas, **Algirdas Ivanauskas**, Rasa Jomantienė 2012-12-05. Galime netekti tokios Kuršių nerijos, kokią esame įpratę matyti. - Vakarų ekspresas. Internetas. file:///C:/Users/vv/Desktop/Pusu%20populiaris%202012/Galime%20netekti%20tokios%20Kur%C5%A1i%C5%B3%20nerijos,%20koki%C4%85%20esame%20%C4%AFprat%C4%99%20matyti%20_%20ve.lt.htm

Tarptautinėje Genų banko duomenų bazėje (NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov) paskelbtos nukleotidinės sekos.

1. Clover phyllody phytoplasma strain CPh clone 4-1 16S ribosomal RNA (*rrnA*) gene, partial sequence 1,246 bp linear DNA KC283211.1, GI:507528229.

2. Dandelion virescence phytoplasma strain DanVir clone 4-9 16S ribosomal RNA (*rrnA*) gene, partial sequence 1,246 bp linear DNA KC283212.1, GI:507528230.
3. Clover phyllody phytoplasma strain CPh clone 10-5-4 16S ribosomal RNA (*rrnA*) gene, partial sequence 1,246 bp linear DNA KC283213.1, GI:507528231.
4. Clover phyllody phytoplasma strain CPh clone 15-7 16S ribosomal RNA (*rrnA*) gene, partial sequence 1,247 bp linear DNA KC283214.1, GI:507528232.
5. Maryland aster yellows phytoplasma strain AY1 clone 112 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 1,244 bp linear DNA KC283215.1, GI:507528233.
6. Dandelion virescence phytoplasma strain DanVir clone 213 16S ribosomal RNA (*rrnA*) gene, partial sequence 1,247 bp linear DNA KC283216.1, GI:507528234.
7. Clover yellow edge phytoplasma strain CYE clone A1 16S ribosomal RNA (*rrnB*) gene, partial sequence 1,248 bp linear DNA KC283217.1, GI:507528235.
8. Clover phyllody phytoplasma strain CPh clone S1 16S ribosomal RNA (*rrnA*) gene, partial sequence 1,246 bp linear DNA KC283218.1, GI:507528236.

PADĖKA

Nuoširdžiai noriu padėkoti visiems, kas tiesiogiai ir netiesiogiai prisidėjo prie šio darbo realizavimo.

Išskirtinės padėkos nusipelno: darbo vadovas Dr. Deividas Valiūnas už vadovavimą šiam darbui ir visapusišką palaikymą; Dr. Rasa Jomantienė už pagalbą įsisavinant molekulinės biologijos metodus ir konstruktyvią kritiką; Habil. Dr. Juozas Benediktas Staniulis už pagalbą renkant vabzdžių ir augalų pavyzdžius bei pagalbą rašant disertaciją.

Dėkoju Dr. Laimai Urbanavičienei už vertingas pastabas rašant šį darbą ir Violetai Ptašekienei už pagalbą rašant disertacijos santrauką anglų kalba.

Padėkos nusipelno dr. Jurga Motiejūnaitė ir dr. Svetlana Markovskaja (GTC (gamtos tyrimų centras) Botanikos instituto mikologijos laboratorija) už pagalbą naudojantis GTC laisvosios prieigos centro binokuliaru ir fotovaizdinimo įranga vabzdžių fotografavimui. Taip pat dėkoju dr. Gražinai Skridlaitei (GTC Geologijos ir geografijos instituto giluminės geologijos laboratorija) už pagalbą ir suteiktą galimybę pasinaudoti GTC laisvosios prieigos centro skenuojančiu elektroniniu mikroskopu FEI QUANTA 250 vabzdžių kūno dalių fotografavimui.

Labai dėkoju prof. Assunta Bertaccini (Bolonijos universitetas) už stažuotės Turino universiteto žemės ūkio, miškininkystės ir maisto produktų departamento (DISAFA) laboratorijoje organizavimą. Jos metu buvo įgyti įgūdžiai bei žinios reikalingos surinktų vabzdžių identifikavimui bei klasifikacijai. Nuoširdus ačiū dr. Luca Picciau, dr. Rosemarie Tedeschci, dr. Federico Lessio, dr. Sabrina Bertin, prof. Alberto Alma (DISAFA) už suteiktas žinias, patarimus, palaikymą ir pagalbą stažuotės metu.

Dėkoju dr. Povilui Ivinskiui (GTC Ekologijos instituto entomologijos laboratorija) už pagalbą apibūdinant vabzdžius bei dr. Guy Söderman (Suomijos aplinkotyros institutas) už sunkiai apibūdinamų vabzdžių identifikavimą.

Finansinė parama

COST parama stažuotei Italijoje ir sekvenavimo kursam Vilniuje pagal FA0807 (Integrated management of phytoplasma epidemics in different crop systems) veiklą.

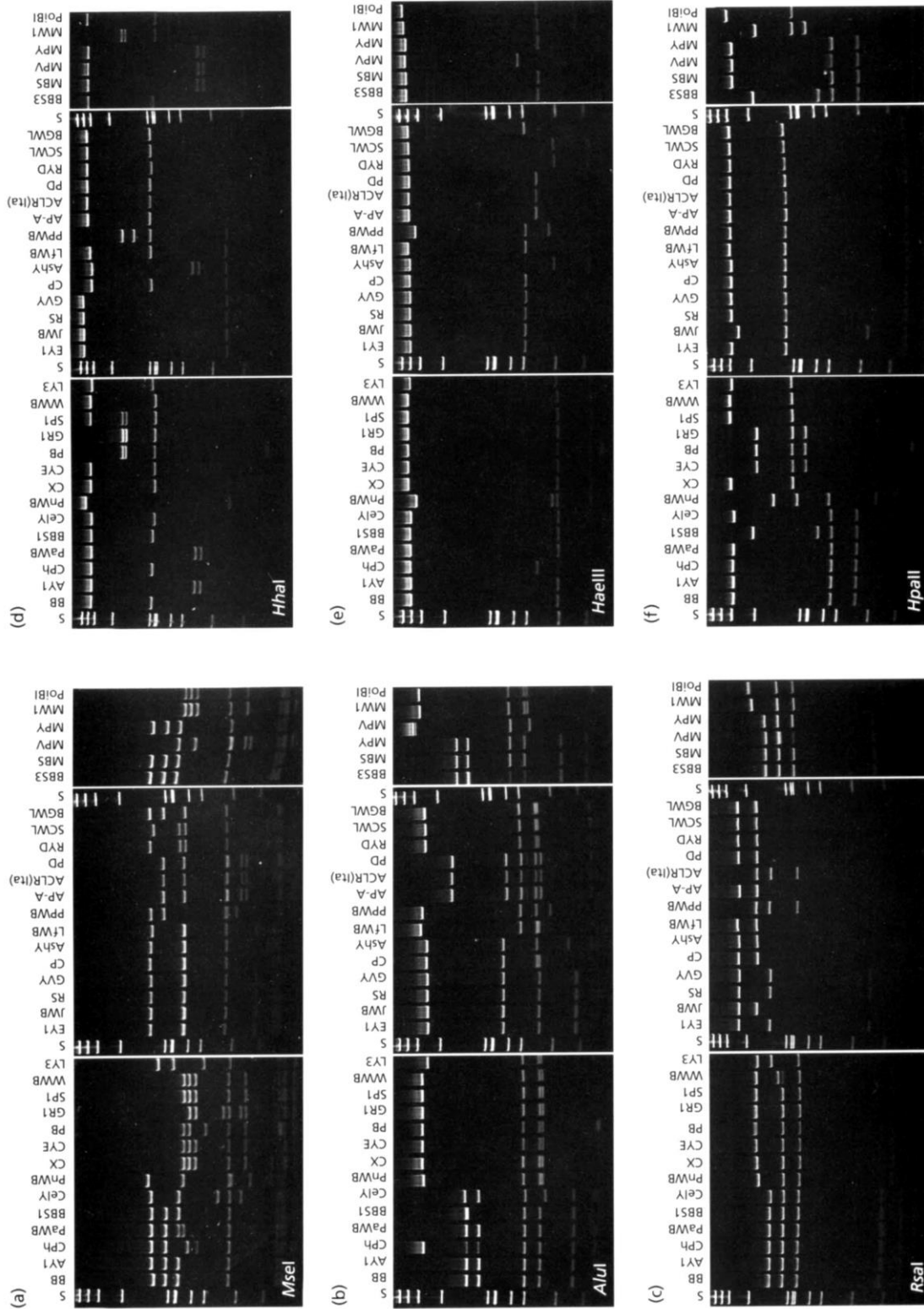
LMT remiamas mokslininkų iniciatyva parengtas (mokslininkų grupių IV kvietimas) projektas, Reg. Nr. MIP-13287, „Spygliuočių patogenų molekulinis identifikavimas UNESCO saugomoje Kuršių nerijoje“, sutarties Nr. MIP-51/2013.

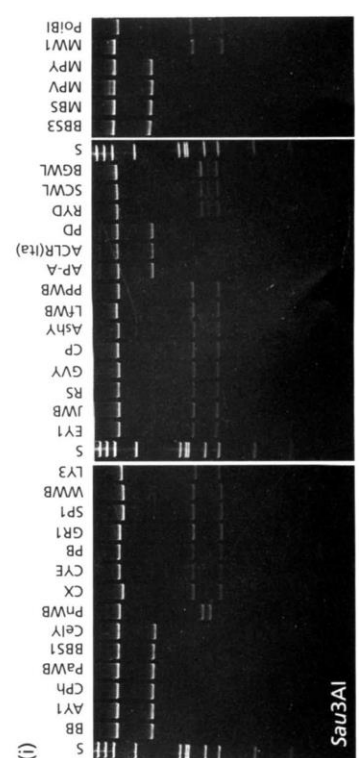
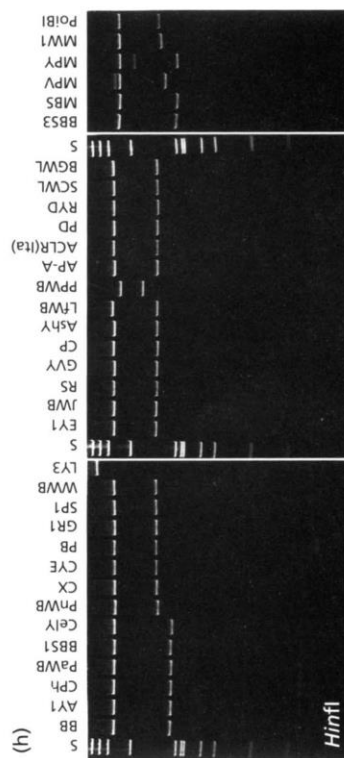
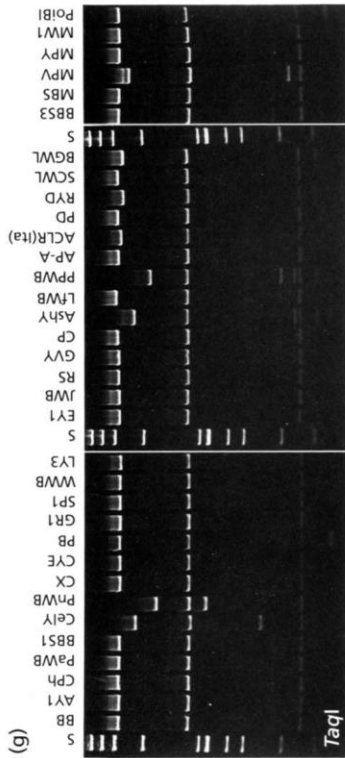
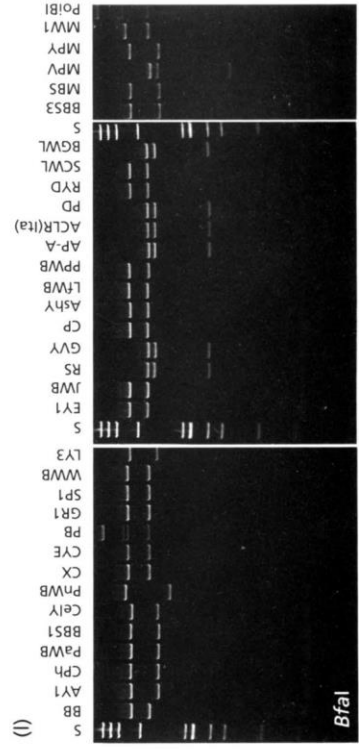
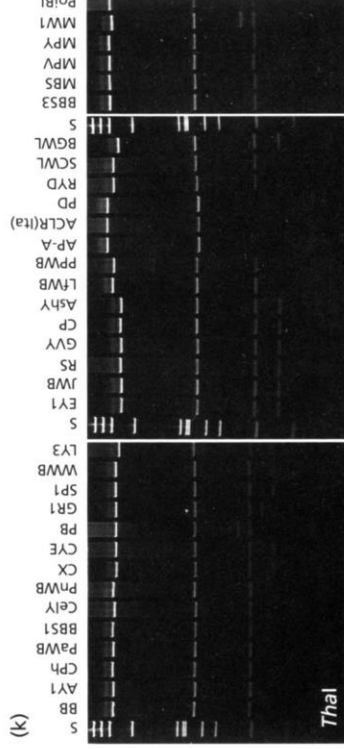
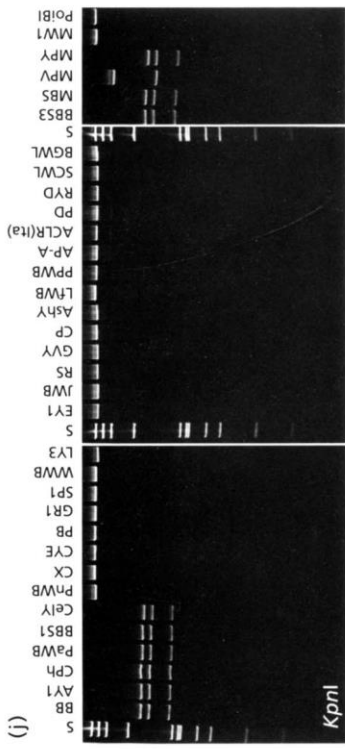
LMT doktoranto stipendija už akademinis pasiekimus DOK–12653, DOK–13605.

PRIEDAI

1 Priedas

Fitoplazmu klasifikācijas shēma pagal 16S rDNR RFIP analīzes profilus (Lee et al., 1998).





2 priedas

Fitoplazmų klasifikacijos schema pagal 16S rDNR virtualius RFIP analizės profilius (Wei et al., 2007).

