

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gamtos mokslų fakultetas

Mikrobiologijos magistro studijų programos II kurso studentas

Tomas Norkus

Magistro darbas

**Slyvų raupų viruso P3-6K1 genominio regiono sekų
analizė Lietuvos ir Ukrainos izoliatuose**

Darbo vadovas

Habil dr. J. Staniulis

Vilnius

2010

Turinys

TURINYS.....	2
SANTRUPŲ SARAŠAS	4
ĮVADAS.....	5
I. LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1. Potyviridae (bulvių Y) virusų šeimos apibūdinimas	6
1.1.1. Potyviridae šeimos virusų šeiminių ir simptomai	7
1.1.2. Potyviridae šeimos virusų poveikis užkrėstoms ląstelėms	9
1.1.2.1. Citoplazminiai intarpai	9
1.1.2.2. Branduolio kristaliniai intarpai (BKI).....	9
1.1.2.3. Kiti citologiniai efektai.....	10
1.2. Slyvų raupų virusas	10
1.2.1. PPV viriono savybės.....	12
1.2.2. PPV viruso pernaša.....	13
1.2.3. PPV padermės	13
1.2.3.1. PPV- M.....	13
1.2.3.2. PPV- D.....	14
1.2.3.3. PPV- El Amar.....	14
1.2.3.4. PPV- C.....	15
1.2.3.5. PPV- W.....	15
1.2.3.6. PPV- Rec	15
1.2.4. Slyvų raupų viruso rekombinacija	16
1.2.5. PPV genai ir jų produktai	16
1.2.6. PPV baltymai.....	17
1.2.6.1. P1.....	17
1.2.6.2. HCPro.....	17
1.2.6.3. P3.....	18
1.2.6.4. 6K1 peptidas.....	19
1.2.6.5. CI.....	19
1.2.6.6. 6K2	20
1.2.6.7. NIa-VPg.....	20
1.2.6.8. NIaPro.....	20
1.2.6.9. NIB.....	21
1.2.6.10. CP	21
1.2.7. PPV simptomai.....	21
1.2.8. Augalų atsparumas PPV infekcijai	22
1.2.9. PPV jautrūs augalai indikatoriai ir viruso simptomai juose.....	23
1.2.10. PPV kontrolė	23
1.2.11. PPV pritaikymas biotechnologijoje	24
II MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI.....	26

2.1. Medžiagos	26
2.1.1. Tiriamieji PPV izoliatai	26
2.1.2. Reagentai	27
2.1.3. Oligonukleotidiniai pradmenys	27
2.1.4. Buferiai	27
2.1.5. Geliai	27
2.1.6. Rinkiniai	28
2.1.7. Fermentai	28
2.1.8. Molekulinės masės standartai ir dažai	28
2.2. Metodai	28
2.2.1. Augalų – indikatorių metodas	28
2.2.2. Totalinės RNR išskyrimas	29
2.2.3. Atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandininė reakcija	31
2.2.4. DNR elektroforezė agarozės gelyje	33
2.2.5. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio	34
2.2.6. Nukleotidinių sekų kompiuterinė analizė	35
III. EKSPERIMENTŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	36
3.1. Augalų indikatorių metodas	36
3.2. PPV P3 – 6K1 genominės srities 863 bp produkto amplifikacija	37
3.3. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio	38
3.4. PPV P3 – 6K1 genominės srities 863 bp produkto nukleotidinių sekų kompiuterinė analizė	39
IŠVADOS	45
SANTRAUKA	46
SUMMARY	47
PADĖKA	48
PUBLIKACIJOS	49
LITERATŪROS SĄRAŠAS	50

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

- BKI** – Branduolio kristaliniai intarpai
- CI** – Citoplazminiai intarpai
- CIP** – Citoplazminius intarpus formuojantis baltymas
- CP** – Apvalkalo baltymas
- DAG** – Konservatyvus aminorūgščių motyvas
- DEPC** – dietilpirokarbonatas
- DIECA** – Natrio dietilditiokarbamatas
- EDTA** – Etilendiamintetraacto rūgštis
- HcPro** – Pagalbinis komponentas
- ICTV** – Tarptautinis virusų taksonomijos komitetas
- ME** – Merkaptio etanolis
- NCR** – Nekoduojanti sritis
- NI** – branduolio intarpus formuojantis baltymas
- NTP** – Nukleotidtrifosfatai
- Poty** – Bulvių Y virusų šeima
- PPV** – Slyvų raupų virusas (*Plum pox virus*)
- PVY** – Bulvių Y virusas (*Potato virus Y*)
- RdRp** – Nuo RNR priklausoma RNR polimerazė
- RFLP** – Restrikcijos fragmentų polimorfizmas
- TEV** – Tabako grviūruotės virusas (*Tabacco etch virus*)
- TurMV** – Turnepso mozaikos virusas (*Turnip mosaic virus*)
- VPg** – su 5' genomo galu susijungęs baltymas

ĮVADAS

Slyvų raupų virusas (*angl. Plum pox virus, PPV*), priklauso bulvių Y virusų šeimai (*Potyviridae, Poty*), *Potyvirus* genčiai. PPV aptiktas praėjusio amžiaus pradžioje Balkanuose (Khan ir kt., 2007), sparčiai plito po pasaulį, šiuo metu aptinkamas visoje Europoje, kai kuriose Azijos, Pietų ir Šiaurės Amerikos valstybėse (Brunt ir kt., 1999), neaplenkė ir Lietuvos (Staniulis ir kt., 1998). PPV sukelia vieną pavojingiausių kaulavaisių ligų – „šarką“. PPV simptomai pastebimi ne iš karto, o tik praėjus kuriam laikui (apie tris metus) nuo užkrėtimo momento, simptomai neryškūs – lapų margumas, žiediškos dėmės lapų ir vaisių paviršiuje, išryškėję lapo gyslos, (Dragoljub ir kt., 1999). Ligos atveju ženkliai sumažėja užsikrėtusių augalų derlingumas, nukenčia vaisių kokybė (derliaus nuostoliai siekia 80 – 100%). Dėl to daugelyje pasaulio valstybių „šarka“ yra įtraukta į karantininių ligų sąrašus (Kurstak, 1981).

Daugiausia mokslininkų tyrinėjančių slyvų raupų virusą dėmesį skiria 3' PPV geno galo tyrimams, ypač apvalkalo baltymo sričiai, bet atsiranda vis daugiau duomenų apie PPV viruso 5' galo sekas ir P3 – 6K1 regioną. Šiuo metu žinoma, kad slyvų raupų viruso P3 – 6K1 genomis regionas – vienas iš veiksnių apsrėdžiančių PPV izoliatų prisitaikymą prie augalo šeimininko, gebėjimą plisti vadžių pagalba, ir priklausomybę PPV – M arba PPV – D padermėms (Saenz ir kt., 2000; Glasa ir kt., 2002). Visuose ankstesniuose šio regiono tyrimuose dažiniausiai apsiribojama izoliatų iš pietų ir vidurio Europos valstybių sekomis todėl, kad gauti daugiau duomenų apie galimą P3 – 6K1 genomio regiono ir viruso geografinio paplitimo ryšį būtina atlikti platesnio masto tyrimus.

Magistro darbo tikslas: atlikti PPV izoliatų iš Lietuvos ir Ukrainos P3 – 6K1 genomio regiono sekų analizę.

Pagrindiniai darbo uždaviniai:

- 1) padauginti PPV virusą augaluose indikatoriuose
- 2) PGR metodu padauginti PPV viruso P3 – 6K1 genomio sekas
- 3) nustatyti tiriamų PPV izoliatų padermes pagal P3 – 6K1 genomio regiono sekas
- 4) gauti ir palyginti PPV P3 – 6K1 genomio regiono sekas tarpusavyje ir su duomenų bazėse prieinamomis sekomis.

Magistro darbą sudaro trys dalys: pirmoje pateikiama informacija apie bulvių Y virusų šeimą ir patį PPV, antroje aprašomi metodai, kuriais buvo remtasi tyrimo metu, trečioje dalyje pateikiami tyrimų rezultatai ir išvados.

I. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Potyviridae (Bulvių Y) virusų šeimos apibūdinimas

Bulvių Y virusų šeimos pavadinimas kilo nuo vieno jos narių (bulvių Y viruso *angl. Potato virus Y*) pavadinimo (Khan ir kt., 2007). Tai – viena iš 6 augalų virusų šeimų, pirmą kartą apibūdintų virusinių dalelių dydžio pagrindu. Pradžioje ją sudarė 16 serologiškai susietų virusų, pasižyminčių lanksčia filamentine struktūra, kurių dalelių ilgis siekė 730-760 nm. Bet paaiškėjus, kad virusinių dalelių ilgis varijuoja priklausomai nuo to, ar terpėje yra divalentių metalo jonų, ar ne, ribos buvo praplėstos, ir dabar yra 650-900 nm (Kurstak, 1981). Šiuo metu tai gausiausia augalų virusų šeima (Hull, 2002).

Poty virusams būdinga filamentinė struktūra, dalelių dydis dažniausiai svyruoja 680-900 nm ribose. Virionų skersmuo svyruoja nuo 11 iki 15 nm. Būdinga spiralinė simetrija. Spiralinės žingsnio ilgis apytiksliai 3 – 4 nm. Virusinės dalelės sudaro $\approx 5\%$ nukleorūgšties ir $\approx 95\%$ baltymo (Khan ir kt., 2007).

Sedimentacijos koeficientas 150 – 160 S. Virionai plūdrūs cezio chloride, kurio tankis siekia $1,31 \text{ g/cm}^3$ (Khan ir kt., 2007). Kiekviena dalelė sudaryta iš vienos plius prasminės RNR molekulės, kurios molekulinė masė yra $3,0\text{-}3,5 \times 10^6$. 5' RNR molekulės gale prisitvirtinęs VPg (*angl. virus protein genome linked*) baltymas, o 3' galas yra poli adenilintas poly(A). Transkripcijos metu transkribuojamas vienas didelis poliproteinas, kuris vėliau suskaldomas į pavienius baltymus (Hull, 2002). Virusinės dalelės aptinkamos šeimnininko citoplazmoje, kur vyksta ir viruso replikacija. Citoplazmoje susidaro įvairūs dariniai – inkliuzijos, kurias galima pastebėti šviesiniu mikroskopu. Šios šeimos atstovai gana stabilūs *in vitro*. Užkrėstuose augaluose viruso koncentracija yra vidutiniška. Bet kai kuriuos Poty atstovus išskirti ir išgryninti yra gana sudėtinga. Daug šios šeimos narių yra serologiškai artimi (Kurstak, 1981).

Gamtoje pagrindiniai šių virusų platintojai – amarai. Bulvių Y šeimos virusai plinta nepersistentiniu būdu, pagalbinio komponento (HCPro) pagalba (Hull, 2002) bei laboratorijos sąlygomis mechaniškai inokuliuojant. Skirtingi šios šeimos atstovai pasižymi skirtingu stabilumu *in vitro*. Dauguma Poty virusų inaktyvuojasi po 10 minučių 50 – 60 °C temperatūroje. Kai kurie virusai gali plisti per sėklas (Khan ir kt., 2007). Nemažai šios

šėimos virusų turi ekonominę reikšmę, ty. gali sukelti derliaus nuostolius, ar net užsikrėtusių augalų žūtį (Matthews, 1992).

1.1.1. Potyviridae šeimos virusų šėimininkai ir simptomai

Daugelio Poty virusų šėimininkų ratas ribotas (Khan ir kt., 2007). Dalis jų geba užkrėsti tik vieną ar keletą tos pačios genties rūšių, arba kelis artimų genčių atstovus. Kitiems šios šeimos atstovams būdingas platesnis šėimininkų spektras. Tik keletas Poty virusų gali būti apibūdinti kaip turintys santykinai platų šėimininkų ratą. Skirtingomis to paties viruso atmainomis gali užsikrėsti skirtingi augalai. Tam tikri Poty virusai gali būti „apmokyti“ užkrėsti kitus (nei jų įprastiniai šėimininkai) augalus, inokuliuojant didelėmis viruso koncentracijomis, tokiu būdu galima užkrėsti rūšis, kurios yra atsparios įprastiniams inokuliacijos būdams.

Vienaskilčius augalus užkrečiantys Poty virusai turi labiau ribotą šėimininkų skaičių nei dviskilčių augalų virusai (Kurstak, 1981).

Laboratorinių tyrimų duomenimis imliausi Poty virusams yra šie augalai: *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *C. murale*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana clevelandii*, *N. tabacum*, *Petunia hybrida*, *Phaseolus vulgaris*, *Tetragonia expansa*.

Universaliausi pasirodė: *N. clevelandii*, *C. quinoa*, *T. expansa*, *Ph. Vulgaris*, kurių pagalba gali būti padauginti ir/arba nustatyti 32 iš 41 tirtu Poty virusai (Kurstak, 1981).

Sisteminės Poty virusų infekcijos atvejais dviskilčių augalų lapuose pasireiškia labai panašūs simptomai: išryškėja lapo gyslos, atsiranda mozaikos, lapo paviršiaus raukšlėtumas, dažnai pastebima nekrozė. Virusinė infekcija sutrikdo normalų augalo metabolizmą, to pasekoje šėimininkas nustoja augęs. Vienaskilčiams augalams pasireiškia ilgi chlorotiški dryžiai po kurio laiko jų vietoje gali pasireikšti nekrozės. Užkrėstose gėlėse, kurioms būdingi antocianų kilmės pigmentai, pastebimi „spalvos lūžiai“ (spalvos pokyčiai), juos sukelia virš 20 Poty virusų. Intensyvesnė nekrozė gali sukelti greitą lapų kritimo (*angl.* leaf-drop streak) efektą, kuris yra vienas pirmųjų bulvių Y viruso požymių jautriose bulvių veislėse. Užkrėstų augalų vaisiai būna netaisyklingos formos, smulkesni. Nuo Poty virusų gali nukentėti papaju, arbūzų, žirnių, bulvių, ir kitų augalų derlius. Kai kuriose slyvų rūšyse (pvz., *Prunus domestica*) užkrėstose slyvų šarkos virusu, prarandamas beveik visas derlius. Vaisiai būna smulkūs, rauplėti, daugelis jų nukrenta nesunokę. Bulvių A virusas (*angl.* Potato A virus)

sumažina šakniagumbių derlių 40%. Runkelių mozaikos (*angl. Beetroot Mosaic virus*) virusas gali ženkliai sumenkinti šakniavaisių derlių. Kai kurie Poty virusai augalams sukelia rimtesnius pažeidimus žemesnėje temperatūroje (10-15 °C) nei šiltose sąlygose (maždaug 25 °C), o esant dar aukštesnėms temperatūroms (apie 30 °C) - beveik besiptomia. Net trumpalaikis aplinkos atvėsimas gali sukelti staigų simptomų išryškėjimą (Ross, 1970).

Augalai užsikrėtę kai kuriais Poty virusais kitaip reaguoja į grybinės kilmės patogenus. Pavyzdžiui, žirniai, užsikrėtę sojų mozaikos virusu (*angl. Soybean Mosaic virus*) yra daug jautresni šaknų puviniai nei šiuo virusu neužkrėsti augalai. Padidėjęs maistingųjų medžiagų sunkimasis iš virusų užkrėstų augalo šaknų, sukuria palankias sąlygas *Fusarium* inokuliacijai (Kurstak, 1981).

Kai kuriais atvejais yra stebimas sumažėjęs fotosintezės intensyvumas Poty virusais užkrėstuose augaluose. Pavyzdžiui, tabako graviūruotės (*angl. Tobacco etch virus*) virusu (TEV) užkrėsto augalo audiniuose redukuojasi chloroplastų, kartu ir chlorofilo kiekis, tačiau fotosintezė sumažėjo 13% daugiau nei to buvo galima tikėtis pagal chloroplastų skaičiaus sumažėjimą. Bet cukranendrėse, užkrėstuose cukranendrių mozaikos (*angl. Sugarcane Mosaic virus*) virusu fotosintezės intensyvumo sumažėjimas buvo silpnesnis, nei tikėtasi pagal chlorofilo kiekio sumažėjimą. (Hampton ir kt., 1966).

Padidėjęs kvėpavimo intensyvumas pastebėtas *N. glutinosa* augaluose, užkrėstuose turnepso mozaikos virusu (*angl. Turnip Mosaic virus*). Tabako lapus užkrėtus TEV jų kvėpavimo lygis padidėja 40% lyginant su sveikais augalais (kontrolė).

Poty virusais užkrėstuose augaluose gali padidėti bendras baltymų kiekis, sumažėti nitratų kiekis, pasikeisti amino rūgščių sudėtis (pavyzdžiui, čili *Capsicum annuum*). Tabako augalus užkrėtus Poty virusais padaugėja glutamino, prolino, asparagino amino rūgščių kiekis. Tačiau laisvųjų amino rūgščių sudėties pokyčiai beveik nesiskiria tarp bulvių Y ir X virusų šeimų (*angl. Potato virus X*). Užkrėstuose augaluose gali sumažėti auksinų kiekis, pasikeisti Na⁺ ir K⁺ jonų pralaidumas (Tu ir kt., 1970).

Neabejojama, kad Poty virusai kenkia simbiotinėms *Rhizobium sp.* bakterijoms. Sojos mozaikos virusu (*angl. Soybean Mosaic virus*) užkrėstuose sojų augaluose šaknų gumbotumas sumažėjo iki 80 procentų (Kurstak, 1981).

1.1.2. Potyviridae šeimos virusų poveikis užkrėstoms ląstelėms

Bulvių Y virusų šeimos nariams būdinga sudaryti citoplazminius ir brandulio kristalinius intarpus (BKI) virusų užkrėstose augalo ląstelėse (Khan ir kt., 2007).

1.1.2.1. Citoplazminiai intarpai

Visi Poty virusų šeimos nariai suformuoja viduląstelinius citoplazminius intarpus. Šie intarpai dažniausiai būna cilindro formos, dalis jų bent jau pradinėse vystymosi stadijose – kūgiškos formos (Matthews, 1992).

Citoplazminiai intarpai pirmą kartą aptikti 1958 metais augaluose, užkrėstuose PVY (*angl. Potato virus Y*). Tada jie buvo klaidingai palaikyti savaime susidarančiais virusinių dalelių dariniais. Tačiau pasirodė, kad Poty virusų sukeliama citoplazminiai intarpai yra sudaryti iš vienos polipeptidinės grandinės baltymo (molekulinė masė $67-70 \times 10^3$), kuris skiriasi nuo viruso apvalkalo baltymo. Išgryninus penkių skirtingų Poty virusų citoplazminius intarpus ir gavus jiems specifinius antikūnus buvo atlikti serologiniai tyrimai, kurie parodė, kad visi penki intarpus sudarantys baltymai yra serologiškai skirtingi (Kurstak, 1981). Jų nuoseklūs tyrimai parodė, kad intarpai infekcijos metu kinta: keičiasi jų dydis, forma, skaičius ir padėtis ląstelėje (Khan 2007).

Citoplazminių intarpų funkcija nežinoma, jų ryšiai su plazmodezmomis ankstyvose stadijose leidžia manyti, kad jie kažkokiu būdu yra susiję su viruso dalelių bei jų komponentų tarpląsteliniu transportu (Kurstak, 1981).

1.1.2.2. Brandulio kristaliniai intarpai (BKI)

TEV sukelia kristalinius brandulio intarpus, kurie dažniausiai aptinkami brandulio karioplazmoje, retai ląstelės citoplazmoje. BKI aptikti šviesiniu mikroskopu. Tuo metu manyta, kad jiems būdinga stačiakampio forma, vėlesni tyrimai atlikti elektroniniu mikroskopu parodė, kad BKI yra keturkampės piramidės nupjautu viršumi formos.

Pradžioje buvo manoma, kad BKI gali būti taisyklingi viruso dalelių dariniai, bet tolimesni tyrimai parodė, jog jie sudaryti daugiausia iš baltymų (gali būti, kad vien iš baltymų) (Kurstak, 1981).

1.1.2.3. Kiti citologiniai efektai

Pastebėta, kad užkrėstose drignių mozaikos virusu (*angl. Henbane mosaic virus*) *Datura stramonium* lapų ląstelėse kartais susidaro neįprasti agregatai iš nenormaliai pailgėjusių mitochondrijų. Mitochondrijos pailgėja 5 μm ir yra sukabinamos savo šoniniais paviršiais. Jas jungia virusinių dalelių sluoksnis, bet jose nepastebėta jokių struktūrinių pakitimų. Mitochondrijų agregacija gali būti būdinga visose Poty virusų užkrėstose ląstelėse (Weintraub ir kt., 1973).

Poty virusams būdingi ne tik mitochondrijų agregatai, agregavę chloroplastai rasti *C. quinoa* lapų parenchimos ląstelėse užkrėstose TurMV. Bet tai nebūdinga pupelių mozaikos virusu (*angl. Bean mosaic virus*), salotų mozaikos virusu (*angl. Lettuce mosaic virus*), salierų mozaikos virusu (*angl. Celery mosaic virus*) užkrėstose augaluose. Virusinių dalelių sluoksnis susidaro lygiagrečiai gretimoms chloroplastams (jis juos tarsi suklijuoja), toks sluoksnis gali susidaryti ir tarp pavienių chloroplastų bei tonoplasto. Chloroplastų agregacija gali būti panaudota TurMV identifikacijai (Kurstak, 1981).

Pavienės Poty virusų dalelės ar nedidelės jų sankaupos retkarčiais randamos atsitiktinai pasiskirsčiusio visoje užkrėstų ląstelių citoplazmoje, arba plazmodesmose. Dažniausiai Poty virusai randami pavienėmis sankaupomis išsidėsčiusiomis lygiagrečiai tonoplastui ar ląstelės plazminei membranai. Įprastinis virusinių dalelių išsidėstymas lygiagrečiai tonoplastui vyksta dėl atsitiktino virusinių dalelių patekimo ir negalėjimo ištrūkti (spąstų principas) ir/arba aktyvaus jų šalinimo iš citoplazmos į vakuolių vidų. Bet koku atveju sluoksniuoti (kaip popieriaus lapai), ar brūkšnių pavidalo (kaip kopėčios) virusinių dalelių dariniai yra būdingi visai Poty virusų šeimai (Kurstak, 1981).

1.2. Slyvų raupų virusas

Slyvų šarkos virusas, kitaip slyvų raupų virusas, galimas sinonimas – slyvų virusas 7 (*angl. Prunus virus 7*). ICTV patvirtintas akronimas: PPV.

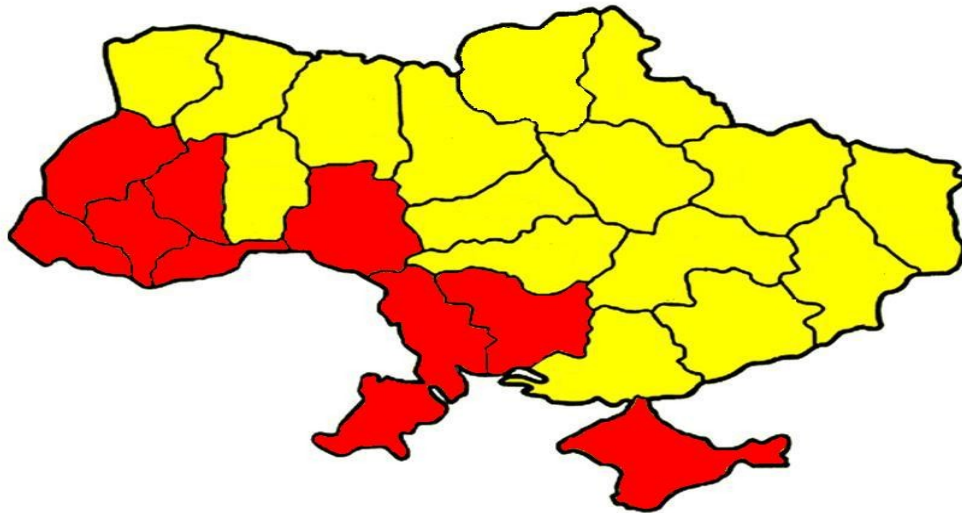
Šiuo metu žinomi šešios slyvų raupų viruso padermės (Glasa ir kt., 2002).

Liga – „šarka“ sukeliama slyvų raupų viruso pirmą kartą pastebėta 1915 m. Bulgarijoje. 1932 metais nustatyta, kad ją sukelia virusas (Khan ir kt., 2007). Pradžioje plitęs lėtai (1935m. pasiekė Jugoslavija, apie 1941m. Vengrija), 1950m. PPV užkrato plitimo

greitis pastebimai išauga. 1956m. virusas patenka į Vokietiją, 1961m. Lenkiją ir Rusiją, 1970m. Prancūziją, 1984m. aptinkamas Ispanijoje. Europoje „šarka“ tapo labiausiai kaulavaisius niokojančia liga (Dragoljub., 1999). Paaiškėjo, kad 100 milijonų medžių gali būti užsikrėtę šiuo virusu. PPV užkrato plitimas nesustoja ir virusas toliau plinta Eurazijoje bei Šiaurės Afrikoje. 1992m. PPV simptomai užfiksuoti Čilės teritorijoje (virusas „perplaukė“ Atlantą). Slyvų raupų virusas aptiktas ir Šiaurės Amerikoje (JAV Pensilvanijos valstijoje), bet jį pavyko lokalizuoti bei buvo manoma, kad infekcijos plitimą pavyks sustabdyti. Bet 2006 metais Niagaros apygardoje (JAV) aptikti keli slyvos medžiai užsikrėtę PPV, tais pačiais metais virusas aptiktas ir Mičigano valstijoje (JAV). PPV invazijos nepavyko išvengti ir Kanadai (Brunt ir kt., 1999)

Pirmieji duomenys patvirtinantys PPV paplitimą Lietuvoje gauti 1995 metais, panaudojant ELISA metodą ištyrus Kauno regione augančių kaulavaisių pavyzdžius. Lietuviški izoliatais 1997 metais buvo užkrėsti žoliniai augalai, kuriuose virusas – padaugintas. ELISA testui panaudojant monokloninius padermei specifinius antikūnus nustatyta kad, jie priklauso PPV – D padermei (Staniulis et al., 1998; Jeckevicienė, Staniulis, 2003).

Ukrainoje PPV pirmą kartą aptiktas Chernivtsy apylinkėse 1966 metais (Piskun, 1969). 1969 metais vietiniai infekcijos židiniai aptikti Chernivtsy, Lvovo, Užkarpatės, Ternopil, Ivano – Frankivskis ir Vinnitsya regionuose. 1993 metų pradžioje buvo nustatytos viruso pasklidimo šalyje ribos. PPV nustatytas 83 ūkiuose, Chernivtsy, Lvovo, Užkarpatės, Ternopil, Ivano – Frankivskis, Mykolayiv, Odessos ir Vinnitsya regionai parodyti kaip: riboto viruso paplitimo zonos, likę šalies teritorijose virusas nebuvo aptiktas. Priemonės kurių buvo imtasi sustabdyti viruso plitimui, pasirodė gana veiksmingos Vinnitsya, Ivano – Frankivskis ir Mykolayiv regionuose, tačiau kitose anksčiau paminėtose zonose, nepaisant taikomo griežto karantino, virusas ir toliau sėkmingai plinta (Ratunshnyak, 2003). 2006 metais PPV plitimas patvirtintas 6 Ukrainos regionuose (Chernivtsy, Lvovo, Užkarpatės, Ternopil, Odessos ir Krymo), bendras infekuotų sodų plotas 4543,9 ha (Ukrainos karantino tarnybos duomenys 2006). Pirmame paveikslėlyje raudonai pažymėti regionai, kuriuose 1966 – 2006 metų laikotarpiu buvo nustatytas PPV.



1 pav. PPV paplitimas Ukrainoje, teritorijos kuriose PPV aptinkamas pažymėtos raudonai.

1.2.1. PPV viriono savybės

PPV nukleokapsidė siūliška 660-720 nm ilgio, diametras siekia 18 nm. Sedimentacijos koeficientas - 180 S (Dragoljub ir kt., 1999). Terminės inaktyvacijos taškas 52 – 58 °C. Užkratas gyvybingas *in vitro* išlieka 3 – 4 dienas (Rankovič, 1976).

Virionas sudarytas iš 7% nukleorūgšties, 93% baltymų, lipidai į virusinės dalelės sudėti neįeina (Dragoljub ir kt., 1999).

Genetinė PPV medžiaga – vienvija plius prasminė RNR molekulė (Dunez ir Šutic, 1988). Genomo replikacija vyksta augalo šeimininko ląstelių citoplazmoje. Replikacijai pagalbinis virusas (angl. helpervirus) nereikalingas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/>).

Aptiktas vienas struktūrinis į viriono sudėtį įeinantis baltymas, sudarytas iš trijų domenų (Salvador ir kt., 2006). Didžiausias domenas 43500 Da, vidutinis – 29000 Da, mažiausias – 27000 Da masės (Dragoljub ir kt., 1999).

Virionai aptinkami lapų (mezofilio), ksilemos, žiedų, pumpurų, vaisių, žievės bei jaunų ūglių ląstelių citoplazmoje. PPV infekcijos metu susidaro ląstelės citoplazminiai intarpai. Jie gali būti amorfiniai X – kūneliai (*angl.* amorphous X-bodies), malūnėlio ar adatos pavidalo (Khan ir kt., 2007) bei kitokių neįprastų formų. Šie intarpai, tai – baltyminiai parakristalai (sudaryti iš baltymų, o ne iš virionų). Susiformavusius parakristalus apsupa polisominė membrana. Be citoplazminių intarpų stebima branduolio išorinio apvalkalo evaginacija (išlinkimas į išorę), chloroplastų išorinio apvalkalo invaginacija (įlinkimas į vidų),

nukleoproteinų sintezės suintensyvėjimas ir ribosomų skaičiaus augimas). PPV serologiškai susietas su PVY, tačiau ryšys – silpnas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>).

1.2.2. PPV viruso pernaša

Slyvų raupų virusas plinta užkrato pernešėjo (vektoriaus) pagalba. Užkratas gali būti perneštas ir mechaninės inokuliacijos būdu, skiepijant, abrikosuose plinta per sėklas (PPV – M tipas), bet nepersiduoda augalų mechaninio kontakto metu (Brunt ir kt., 1999).

PPV vektoriai – vabzdžiai (amarai). Dažniausiai virusą perneša *Brachycaudus helichrysi*, *Myzus persicae*, *M. humuli*. Infekcija plinta nepersistentiniu būdu (Dragoljub ir kt., 1999).

1.2.3. PPV padermės

Šiuo metu žinomos šešios slyvų raupų viruso padermės: PPV – M (Marcus), PPV – D (Dideron), PPV – EA (PPV – El Amar), PPV – C (Cherry), PPV – W (Winona) ir PPV – Rec (Recombinant) (Serçe ir kt., 2009). Padermės išskiriamos pagal tam tikrus genetinius, serologinius, ir biologinius skirtumus (Fanigliulo ir kt., 2003 Myrta ir kt., 2006). Neatitikimai atsiranda skirtumų nukleo- ir amino- rūgščių lygyje, nepaisant vienodos PPV padermių genetinės organizacijos. Dėl šių skirtumų varijuoja atskirų štamų šeimininkų ir vektorių ratas, išryškėja jų sukeltų simptomų skirtumai. Dėl to PPV štamo nustatymas yra būtinas efektyviai ligos kontrolei (Myrta ir kt., 2006). Priskiriant konkretų virusą vienai ar kitai padermei, yra remiamasi molekuliniais metodais, pagrįstais imunofermentine reakcija, panaudojant padermei specifinius monokloninius antikūnus, tam tikrų viruso genomo sričių restrikcijos fragmentų ir/arba PGR produktų analize (Candresse ir kt., 1998).

1.2.3.1. PPV – M

PPV – M kartu su PPV – D buvo pirmosios slyvų išskirtos raupų viruso padermės. Jas pavyko nustatyti panaudojant padermei specifiskus monokloninius antikūnus. PPV – M aptikta praėjusio amžiaus aštunto dešimtmečio pabaigoje - Prancūzijoje (Candresse ir kt., 1998). Tai – viena ekonomiškai svarbiausių iš visų žinomų slyvų raupų viruso padermių. PPV

– M labiau paplitusi centrinėje, rytų, ir pietryčių Europoje (Szemes ir kt., 2001). Lyginant su PPV – D, PPV – M padermė turi platesnį šeimininkų spektrą ir plinta greičiau, lengviau infekuoja persikus ir abrikosus (Poggi Polini ir kt., 1997). Šioje padermėje išskiriami du potipiai, kuriuos pavyko nustatyti panaudojant monokloninius antikūnus. Pirmasis potipis pasižymi tipiškomis PPV – M savybėmis (reaguoja tik su PPV – M specifiniais antikūnais). Antrasis – apvalkalo baltymo sudėtyje turi PPV – D padermei tipiską epitopą (reagavo ir su PPV – M ir su PPV – D tipiškais antikūnais). Yra nustatytas ryšys tarp potipių ir tam tikrų geografinių sričių: pirmasis pogrupis dažniausiai aptinkamas izoliatuose iš rytų ir centrinės Europos (Vengrijoje, Slovakijoje, Vokietijoje), antrasis – Viduržemio jūros šalyse (Graikijoje, Italijoje, Turkijoje, Slovakijoje, Prancūzijoje) (Myrta ir kt., 2001).

1.2.3.2. PPV – D

Dažniausiai PPV – D padermė aptinkama vakarų Europos ir kai kuriose Viduržemio jūros šalyse (Candresse ir kt., 1998). Nors PPV – D yra mažiau agresyvi lyginant su PPV – M (Poggi Pollini *et al.*, 1997), tačiau pasaulio mastu ji plačiau paplitusi. Būtent PPV – D padermė buvo aptiktas Čilėje bei kitose P. ir Š. Amerikos valstybėse (Herrera ir kt., 1997; Rosales ir kt., 1997). Tai gali būti paaiškinama mažesniu jos agresyvumu (silpnėsi ir sunkiau pastebimi simptomai), todėl ji gali lengviau plisti su sodinamąja medžiaga. Lyginant su PPV – M, PPV – D padermė lengviau plinta skiepijant (vegetatyviškai dauginant), bet mažiau efektyviai pernešamas vektorių (Lansac *et al.*, 1997) – tai dar viena jo platesnio paplitimo priežastis.

1.2.3.3. PPV – El Amar

Pirmą kartą PPV – EA izoliatas aptiktas Egipte (Nilo deltos regione). Ji plinta PPV būdinga maniera (vektorius pagalba) nepersistentiniu būdu. Kad PPV – EA yra atskira slyvų raupų viruso padermė, buvo patvirtinta atlikus jos 3' galo 4773 nt regiono tyrimus. Tik 2006m buvo nusekvenuotas visas PPV – EA genomus. Nustatyta kad PPV – EA pasižymi būdinga visoms PPV padermėms bendra genomo organizacija. Nukleorūgščių sąstatas atitiko 79- 80%, 77% ir 77% (atitinkamai D/M, C, W) štamų genomus, tačiau skirtumai tarp amino rūgščių svyravo tik nuo 87% iki 91%. Tai galima paaiškinti didelėmis mutacijų gausa trečioje kodono pozicijoje (šios mutacijos dažniausiai būna tylinčios) (Myrta ir kt., 2006).

1.2.3.4. PPV – C

Ilgą laiką buvo manoma, kad slyvų raupų virusas negali užkrėsti vyšnių (*Prunus cerasus* L.) ir/arba jos yra labai atsparios viruso infekcijai. Tačiau Moldovoje atradus PPV – C padermę paaiškėjo, kad tai nėra tiesa. PPV – C padermė geba ne tik užkrėsti vyšnius, bet gali būti perduota kitiems, labiau PPV tipiškams šeiminiams (tokiems kaip persikai ir abrikosai) (Nemchinov ir kt., 1996). Vėlesni tyrimai parodė šios padermės gebėjimą infekuoti dar platesnį šeiminių spektrą, ja gali užsikrėsti ir trešnes (pirmoji PPV – C užsikrėtusi trešnė aptikta Italijoje) (Fanigliulo ir kt., 2003). Iš dalies nusekvenavus PPV – C genomą (3' galą) buvo nustatytas stebinant divergencijos laipsnis lyginant su PPV – M, PPV – D, PPV – EA tipais. Bet tarp PPV – C izoliatų, išskirtų iš užkrėstų vyšnių ir trešnių, didelio skirtumo nepastebėta (Fanigliulo ir kt., 2003).

1.2.3.5. PPV – W

PPV – W padermė pirmą kartą aptikta Kanadoje 2003 metais, išskirta iš slyvos. Tolimesnių tyrimų eigoje paaiškėjo, kad jos negalima priskirti jokiai iki tol žinomai slyvų raupų viruso padermei (James ir kt., 2003).

1.2.3.6. PPV – Rec

PPV – Rec slyvų raupų viruso padermė buvo nustatyta atlikus netipiškai su padermei specifiniais monokloniniais antikūnais reagavusių (teigiamas rezultatas tiek su PPV – D tiek su PPV – M specifiniais antikūnais) izoliatų NIb (C – galinės) – CP (N – galinės) geno sritys analizę. Patvirtinusią, natūralią rekombinaciją tarp PPV – D ir PPV – M padermių, tame pačiame rekombinacijos taške visais tirtais atvejais. PPV – Rec padermės izoliatams būdinga besimtomė infekcijos eiga augale indikatoriuje persike GF350 ir dvigubos apvalkalo baltymo juostos susidarymas imunoblotingo metu. PPV – Rec štamai dažniausiai aptinkami centrinės Europos (Čekija, Vengrija, Slovakija) ir Balkanų valstybėse. Remiantis izoliatų gausa ir jų genetinė įvairovė manoma, kad PPV – Rec padermė susiformavo vienoje iš buvusių Jugoslavijos valstybių (Glasa ir kt., 2005).

1.2.4.. Slyvų raupų viruso rekombinacija

Ilgą laiką rekombinacija nebuvo laikyta reikšmingu procesu PPV viruso evoliucijoje. Pirmieji pranešimai apie PPV rekombinantus buvo palaikyti retomis išimtimis iš taisyklės, neatspindinčiomis realios situacijos (Glasa ir kt., 2002). Tačiau didėjantis pranešimų srautas apie rekombinacijos atvejus tarp skirtingų PPV padermių (ypač PPV – M ir PPV – D), privertė pakeisti nuomonę. Nežiūrint kilmės ir izoliatų aptikimo laiko, visais atvejais viruso genomo sritis, kurioje vyko rekombinacija, buvo ta pati (PPV genomo N1b regiono 3' gale), šiuo metu tokie rekombinantiniai PPV izoliatai priskiriami naujai PPV – Rec padermei (Glasa ir kt., 2005) . Pilnai nusekvenotų PPV padermių genomų analizė suteikė duomenų apie žymiai seniau įvykusi rekombinacijos procesą, palikusi žymę PPV tipų evoliucijoje. Jo metu PPV – M, PPV – D padermės dalinosi 5' genomo regionu (NCR), rekombinacija vyko vienoje iš šių sričių: 5'- NCR plius P1 gene, HCPro gene, ir P3 geno N gale. Tai paaiškina didelį P1 geno konservatyvumą tarp slyvų raupų viruso D ir M padermių, lyginant su kitais Poty šeimos virusais. Tuo tarpu PPV – C (greičiausiai ir PPV – EA) susiformavo savarankiškai. Neseniai atskleistas dar vienas slyvų raupų viruso rekombinacijos mechanizmas (aptiktas izoliatas buvo mozaika, rekombinacija vyko dvejuose taškuose: HCPro ir P3 regione).

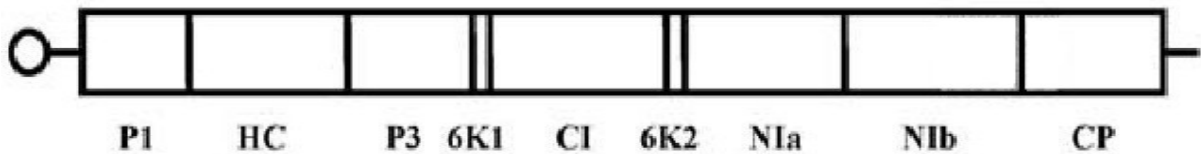
Rekombinantai niekuo nenusileidžia nerekombinantiniams PPV padermėms tiek bandymų metu, tiek lauko sąlygomis. Jų pernašos efektyvumas vektorių pagalba išlieka nepakitęs. Taip pat jų tarpe nepastebėta jokių replikacijos sutrikimų.

PPV rekombinantus galima aptikti derinant metodus, pagrįstus specifinių apvalkalo baltymo (*angl.* coat protein, CP) geno sričių skirtumais su N1b - CP genų jungties tyrimais, arba panaudojant citoplazminius intarpus formuojančio baltymo (*angl.* cylindrical inclusion protein, CI) pagrindu sukurtas procedūras (James ir kt., 2006;).

1.2.5. PPV genai ir jų produktai

PPV genomas turi ilgą atviro skaitymo rėmelį, kuris transkribuojamas visos virusinės infekcijos metu, pradėdamas nuo antro AUG kodono. Pradinis translacijos produktas – didelis 355,5 kDa baltymas. Translacijos metu ir po jos šis poliproteinas, veikiamas trijų viruso koduojamų baltymų, suskaldomas mažiausiai į dešimt pavienių baltymų. Tačiau būtina

pažymėti, kad susidaro ne vien atskiri baltymai, bet ir visa eilė iš dalies apdorotų poliproteinų, kurie gali būti panaudoti viruso „infekcinei talpai“ (optimaliam virusinių dalelių skaičiui šeimininko ląstelėse) pasiekti (Lopez-Moya ir kt., 2000; Salvador ir kt., 2006). 2 pav. pavaizduoti PPV genai ir jų išsidėstymas.



2 pav. PPV genai (Salvador ir kt., 2006)

1.2.6. PPV baltymai

1.2.6.1. P1

P1 yra pirmasis poliproteino C galo komponentas, pasižymintis didžiausiu variabilumu (varijuoja amino rūgščių sekos ir baltymo masė) tarp visų *Potyviridae* šeimos virusų. Nepaisant to, šio baltymo C galinis regionas yra santykinai konservatyvus. Jis talpina serino proteazės domeną, stipriai besiskirianti nuo ląstelės proteazių (Verchot ir kt., 1991). P1 – stipriai bazinis baltymas. Pastebėta, kad kai kuriuose Poty šeimos virusuose jis geba surišti RNR (Mertis ir kt., 1998). Tai leidžia teigti, kad jis yra svarbus viruso replikacijos, transliacijos, ir/arba virusinės RNR translokacijos procesuose. Yra įrodytas P1, kaip papildomo faktoriaus, vaidmuo viruso genomo amplifikacijoje. Manoma, kad didelis šį baltymą koduojančios srities nukleotidų variabilumas yra susijęs su tam tikru jo vaidmeniu, apsprendžiant viruso šeimininkų ratą. Nukleotidų pakitimai P1 srityje leidžia PPV virusui efektyviau infekuoti kai kuriuos žolinius augalus bei gali būti susieti su infekcijos simptomų kitimu juose (Salvador ir kt., 2006).

1.2.6.2. HCPro

Poty virusuose HCPro vaidina polifunkcinio baltymo vaidmenį (Maia ir kt., 1996). Iš pradžių jis buvo apibūdintas kaip faktorius, būtinas viruso plitimui vektoriaus (amarų) pagalba iš augalo į augalą (Govier ir kt., 1977). HCPro taip pat susijęs su genomo amplifikacijos, infekcijos plitimo šeimininko audiniuose, viruso patekimo į sėklas procesais

(Salvador ir kt., 2006). Jis dalyvauja PPV sąveikoje su kitais augalų virusais (Gonzalez- Jara ir kt., 2004). HCPro – cisteino proteazė, pasižyminti autokatalitinėmis savybėmis (HCPro savaime išsikerpa iš poliproteino) (Salvador ir kt., 2006). Nustatytas HCPro dalyvavimas virusui apeinant šeimininko gynybinius mechanizmus, susijusius su RNR nutildimu (Brigneti ir kt., 1998). Taip pat HCPro gali sąveikauti su miRNR, sumažindamas šeimininko galimybes pasipriešinti infekcijai (Kasschau ir kt., 2003). HCPro dalyvavimas RNR nutildimo slopinime gali lemti ir kai kurias kitas jo savybes. Šis baltymas gali sąveikauti pats su savimi, be to pastebima jo sąveika su šeimininko ar kitais virusinės kilmės baltymais (Salvador ir kt., 2006). Sąveika su virusinių dalelių paviršiniais baltymais ir amaro stiletto paviršiumi, leidžia virusui plisti vektoriaus pagalba (Blanc ir kt., 1998). Salotų mozaikos viruso (*angl. Lettuce mosaic virus*) HCPro pasižymi gebėjimu prisijungti prie 20 S proteosomos ir inhibuoti jos endonukleazinį aktyvumą. Manoma, kad tai užtikrina viruso apsaugą nuo ląstelės endonukleazių infekcijos metu. Tai būdinga ne tik šiam virusui, bet ir visai Poty virusų šeimai (Balut ir kt., 2005).

1.2.6.3. P3

Apie P3 baltymo funkcija iš visų Poty šeimos virusams būdingų baltymų žinoma mažiausiai. Tai lemia maža baltymą koduojančių sekų homologija tarp skirtingų šeimos narių ir prieštaringi eksperimentų rezultatai. P3 baltymas randamas tiek augalo šeimininko ląstelių citopazmoje (kur sudaro kompleksus su CI baltymu), tiek branduolyje. Toks jo pasiskirstymas ląstelėje paaiškintas tuo, kad susidaro dvi skirtingos baltymo formos veikli ir neveikli, kurios transportuojamos į skirtingas šeimininko ląstelių struktūras (Rodriguez- Cerezo ir kt., 1993; Urcuqui-Inchima ir kt., 2001).

Nors, P3, 6K1 ir 6K2 peptidas yra vieninteliai Poty virusams būdingi baltymai nepasižymintys RNR surišančiu aktyvumu manoma, kad P3 yra susijęs su viruso replikacija. Tai patvirtina ir eksperimentiniai duomenys mutacijos tam tikrose šio baltymą koduojančių sekų vietose sutrikdo normalią Poty virusų replikacijos eigą. Greičiausiai P3 įtaką replikacijos procesams lemia jo gebėjimas sąveikauti su CI baltymu, kuris yra replikacinio komplekso dalis Bulvių Y šeimos virusuose (Urcuqui-Inchima ir kt., 1993; Klein ir kt., 1994). Taip pat pastebėtas P3 gebėjimas sudaryti sąveikas ir su kitais Poty virusų baltymais (P3, P1, NIa ir NIB) (Guo ir kt., 2001).

1.2.6.4. 6K1 peptidas

6K1 peptidas Poty virusuose yra konservatyvesnis už prieš jį esantį P3 baltymą. Šis peptidas turi hidrofiliinį regioną, kuris dalyvauja virusui integruojantis į ląstelės membraną. *In vitro* segmentacija tarp P3 baltymo ir 6K1 peptido yra nepilnai išreikšta, tačiau tai neturi įtakos viruso gyvybingumui (Salvador ir kt., 2006). Vis dėlto mutacijos, turinčios vienokios ar kitokios įtakos šios srities formavimuisi, sukelia nukrypimus nuo įprasto infekcijos simptomų pasireiškimo laiko bei jų stiprumo pokyčius (Riechmann ir kt., 1995). Tyrimų duomenys leidžia teigti, kad P3 – 6K1 genominė PPV viruso sritis tiesiogiai susijusi su viruso padermių adaptavimuisi prie skirtingų šeimininkų ir turi įtakos infekcijos simptomų pasireiškimui juose. Konstruojant chimerinius virusus *in vitro* pastebėta, kad PPV – M padermės virusams šią sritį pakeitus PPV – D padermės sritimi virusinės infekcijos eiga ir simptomų raiška supanašėja su PPV – D. Procesui didžiausios įtakos turi 74 C galinės P3 – 6K1 regiono koduojamos amino rūgštys (Saenz ir kt., 2000). Manoma, kad jungties tarp P3 ir 6K1 peptido susidarymas vaidina reguliacinį vaidmenį, apsprendžiant P3/6K1 komplekso funkcijas (Salvador ir kt., 2006).

1.2.6.5. CI

Unikalus ir tipiškas Poty virusų šeimos infekcijos požymis – malūnėlio formos citoplazminių intarpų susidarymas, kurie susiformuoja iš cilindrinis intarpus formuojančių baltymų CI. CI priklauso didelei baltymų šeimai, kurios atstovai turi nukleotidtrifosfatus (NTP) surišantį domeną. Šiai šeimai priklausantys baltymai yra plačiai paplitę gamtoje ir dauguma RNR virusų turi bent vieną tokį proteiną (Salvador ir kt., 2006). PPV CI pasižymi NTP-aziniu ir helikaziniu aktyvumais, kurie yra būtini viruso replikacijai (Fernandez ir kt., 1997). CI baltymai ima sąveikauti tarpusavyje, jei aplinkoje nėra kitų virusinės kilmės baltymų, už šią sąveiką yra atsakingos 177 N galinės amino rūgštys (Lopez ir kt., 2001). Manoma, kad CI oligomerizacija nėra susijusi su NTP-aziniu baltymų aktyvumu, bet yra būtina sąlyga veiksmingai RNR helikazės veiklai. Genetinė analizė ir citoplazminių intarpų, sudarytų iš CP, CI, esančių netoli plasmodesminio tinklo, elektroniniu mikroskopu darytos nuotraukos atskleidė CI vaidmenį Poty virusų plitime augaluose iš ląstelės į ląstelę (Salvador ir kt., 2006).

1.2.6.6. 6K2

6K2 baltymas dėl centre turimo hidrofobinio domeno primena 6K1 peptidą. TVE 6K2 baltymas gali sąveikauti su endoplazminio tinklo membranomis kaip integracinis baltymas (hidrofobinio domeno dėka). Manoma, kad jis susijęs su RNR replikacinio komplekso nutaikymu į specifines vietas membranoje (Schaaad ir kt., 1997). Įrodytas ryšys tarp 6K2 baltymo ir tolimojo virusinių dalelių judėjimo bei specifinių simptomų sukėlimo šeimininke (Salvador ir kt., 2006).

1.2.6.7. NIa-VPg

NIa baltymas pirmiausiai buvo aptiktas kai kurių Poty virusų, tame tarpe ir PPV, citoplazminiuose branduolio intarpuose, kaip vienas iš juos sudarančių komponentų, ir kaip proteazė, atsakinga už centrinių bei C galinių poliproteino baltymų raišką (iškerpa juos iš poliproteino) (Salvador ir kt., 2006). Galima sąveika tarp NIa-NIa arba NIa-NIb baltymų, kuri yra aprašyta keliuose Poty šeimos virusuose (Daros ir kt., 1999). NIa turi efektyvius signalus, nukreipiančius baltymą į branduolį. Tai leidžia manyti, kad šis baltymas vaidina tam tikrą, šiuo metu dar gerai nežinomą rolę viruso užkrėstų ląstelių branduoliuose (Schaaad ir kt., 1996). VPg baltymas kovalentiškai (fosfodiesteriniu ryšiu) susijungia su virusine RNR per tirozino liekaną (Salvador ir kt., 2006). VPg gali sąveikauti su RNR replikaze – NIb, manoma, kad jis panaudojamas kaip pradmuo RNR replikacijos pradžioje (Anindya ir kt., 2005). VPg dalyvauja ne tik replikacijos procese, bet yra lemiamas veiksnys specifinio ilgo nuotolio virusinių dalelių judėjimo šeimininke, bei lemia viruso virulentiškumą (Salvador ir kt., 2006).

1.2.6.8. NIaPro

NIaPro baltymas - proteazė. Katalitiniame centre jis turi cisteino liekaną, bet kai kurie jo struktūriniai motyvai labai panašūs į ląstelinės kilmės serino proteazių motyvus (Salvador ir kt., 2006). NIaPro gali nespecifiškai susijungti su RNR. Manoma, tai susiję su jo dalyvavimu virusinės RNR replikacijoje (Daros ir Carrington, 1997). Yra duomenų apie NIaPro gebėjimą degraduoti dviviję DNR (Anindya ir Savithri, 2004). Asparagino liekana baltymo katalitiniame centre yra būtina DNR degradacijai. Biologinė šio reiškinių prasmė nežinoma,

bet manoma, jog tai susiję su NI baltymų nutaikymu į ląstelės branduolį (Anindya ir Savithri, 2004).

1.2.6.9. NIB

NIB yra virusinės kilmės branduolio intarpus formuojantis baltymas. Tai yra nuo RNR priklausoma RNR polimerazė, atsakinga už Poty virusų genomo replikaciją (Hong ir Hunt, 1996). NIB sąveikaudamas su NIa, P1, P3 gana dažnai aptinkamas heterogeniškosiose sistemose (Merits ir kt., 1999). Formuojantis RNR replikaciniam kompleksui funkciniai ryšiai tarp šių darinių yra nežinomi (Salvador ir kt., 2006). NIB taip pat sąveikauja su VPg (manoma, jis tarnauja pradmeniu replikacijos iniciacijoje (Anindya ir kt., 2005).

1.2.6.10. Apvalkalo baltymas (CP)

Pagrindinė augalų virusų apvalkalo baltymo funkcija – viruso genomo sutalpinimas specifinėje struktūroje – kapsidėje. Poty virusų šeimos CP sudarytas iš trijų domenų. Jo N-galinis ir C-galinis regionai išsidėstę virusinės dalelės paviršiuje. Konservatyvus šerdinis domenas yra būtinas virusinių dalelių susiformavimui ir jų plitimui iš ląstelės į ląstelę. N-galinis CP regionas pasižymi ypatingu variabilumu tarp skirtingų Poty virusų. Jis vaidina svarbų vaidmenį viruso plitime. Nustatyta, kad efektyviam viruso plitimui svarbesnis yra tinkamas elektrinis šios srities krūvis nei specifinė aminorūgščių seka (Salvador ir kt., 2006). Konservatyvus N-galinės srities DAG motyvas yra būtinas CP sąveikai su HCPro ir viruso plitimui vektoriaus pagalba (Blanc ir kt., 1997). Slyvų raupų viruso CP yra fosforilnamas (Fernandez-Fernandez ir kt., 2002). Tokia potransliacinė baltymo modifikacija keičia baltymo sugebėjimą prisijungti RNR ir tai galėtų būti vienas mechanizmų, reguliuojančių genomines RNR transliaciją, replikaciją, ir supakavimą į kapsidę (Ivanov ir kt., 2001).

1.2.7. PPV simptomai

PPV simptomai varijuoja priklausomai nuo augalo šeimininko rūšies, amžiaus, jo apsirūpinimo maistinėmis medžiagomis bei kai kurių aplinkos faktorių (pavyzdžiui, temperatūros) (Khan ir kt. 2007). Simptomų sunkumas gali kisti priklausomai nuo viruso padermės, kuria yra užsikrėtęs tiriamas augalas (Dragoljub ir kt., 1999). PPV simptomai

pasireiškia neįprastai. Jie gali išryškėti ant keletu vaisių ar lapų, o visi kiti (vaisiai ir lapai) nerodys infekcijos požymių. PPV simptomai dažniausiai išryškėja praėjus trimis metams nuo augalo užkrėtimo. Lapuose PPV požymiai neryškūs: lapo gyslų geltonavimas ir/arba geltonų ar šviesiai žalių apvalių dėmelių lapo paviršiuje susidarymas. Ant vaisių pasirodo nekrotiškos rudos spalvos zonos, forma tampa netaisyklinga, jie būna smulkesni (lyginant su sveikų augalų vaisiais). PPV infekcijos metu pastebimas ir vegetatinio augimo sulėtėjimas, infekuoti augalai suformuoja trumpesnius ir plonesnius ūglius (Milosevic ir kt., 2009). 3-6 paveikslėliuose pavaizduoti „šarkos“ pažeisti slyvos ir persiko lapai bei vaisiai (3-4 pav. viruso simptomai slyvose, 5-6 pav. persike). Nuotraukos paimtos iš <http://plantclinic.cornell.edu>.



3 pav. PPV infekuotos slyvos vaisiai.

4 pav. PPV infekuotos slyvos lapas.



5 pav. PPV infekuoto persiko vaisius.

6 pav. PPV infekuoto persiko lapai.

1.2.8. Augalų atsparumas PPV infekcijai

Nuo homologijos priklausoma selektyvi RNR degradacija (potransliacinis geno nutildymas) yra susijusi su keletu biologinių reiškinių, tame tarpe ir augalų atsparumu virusinėms infekcijoms. Mažos RNR molekulės komplementariai sąveikaudamos su savo taikiniais (svetimos kilmės RNR), atveda RNR-azes (ribonukleazes), kurios degraduoja

svetimą RNR. To pasekoje nevyksta virusinių baltymų transliacija ir viruso dauginimasis yra nuslopinamas (Pandolfini ir kt., 2003; Agrawal ir kt., 2003).

1.2.9 PPV jautrūs augalai indikatoriai ir viruso simptomai juose

Augalai indikatoriai (jautrūs PPV) ir viruso požymiai juose:

Chenopodium foetidum – geltonos dėmės, kai kurios su nekrotiškais pažeidimais centre, arba nekrotiškos dėmės;

Pisum sativum – lapo gyslų išryškėjimas, chlorotiškos dėmės;

Prunus domestica – chlorotiški žiedai ir dėmės;

P. japonica – chlorotiškos dėmės;

P. maritima – chlorotiškos dėmės, lapo gyslų nekrozė;

P. sibirica – žalios dėmės ir blankus išmarginimas linijomis;

P. tomentosa – nenormali jaunų lapų forma, chlorotiškos dėmės, nekrotiškos dėmės ant senesnių lapų (Dragoljub ir kt 1999);

1.2.10. PPV kontrolė

Slyvų raupų viruso kontrolę galima suskirstyti į keturis etapus: 1) karantinas, 2) užkrėstu augalų naikinimas, 3) vabzdžių populiacijos kontrolė, 4) atsparių PPV augalų veislių selekcija, arba jų sukūrimas genų inžinerijos metodais.

1) Karantinas – plačiausiai šiuo metu taikoma PPV kontrolės priemonė. Tai prevencinės priemonės prieš viruso patekimą į šalį arba jo migraciją į kitus šalies regionus (sodinukų importo reguliavimas, devirusuotos dauginamosios medžiagos naudojimas medelynuose ir panašiai). Jei karantininis virusas sugebėjo patekti į šalį ar regioną, būtina jį kaip galima greičiau aptikti ir sunaikinti. Problemų kelia netolygus PPV pasiskirstymas įvairiose augalo dalyse, tai apsunkina pavyzdžių, kurie toliau bus tiriami laboratorijoje, paėmimą.

2) Aptikus virusu užkrėstus medžius, būtina nedelsiant juos pašalinti bei neleisti atželti ūgliams nukirstų medžių vietoje. Europos sodininkams rekomenduojama prieš atsodinant iškirstą sodą (kaulavaisiais) palaukti tris metus.

3) Naudojant insekticidus iš dalies galima amarų (pagrindiniai PPV vektoriai) populiacijos kontrolė, o tuo pačiu ir slyvų rauų viruso kontrolė. Žinoma, ši priemonė gali tik pristabdyti viruso plitimą, nes visiškai kontroliuoti amarų populiaciją neįmanoma, o juk užtenka vienintelio vabzdžio, kad perneštų infekciją (Brunt ir kt., 1999).

4) Jei konkrečioje vietovėje nuo viruso apsisaugoti negalima, tai vienintelė veiksminga priemonė – atsparių PPV kaulavaisių veislių naudojimas. Vienas seniausiai taikomų metodų gauti augalų virusams atsparius transgeninius augalus – viruso geno ekspresija augale. Dėl homologinės saveikos tarp viruso ir transgeninių sekų, gaunamas specifinis (viruso rūšiai) atsparumas kurio, mechanizmas primena potransliacinį geno nutilmodymą (Lo'pez-Moya ir kt., 2000).

Dažniausiai transgeninis atsparumas Slyvų rauų virusui gaunamas modifikuotame augale ekspresuojant PPV apvalkalo baltymą CP. Eksperimentai su žoliniais augalais turintčiais PPV CP geną atskleidė, kad tokie augalai pasižymi skirtingu atsparumu slyvų rauų virusui, silpnesnis atsparumas PPV buvo tais atvejais kai CP ekspresija buvo aktyvesnė, taip pat kai kurias atvejais pastebėtas uždelstas atsparumas, iš pradžių virusas sėkmingai užkrėsdavo augalus, bet po kurio laiko būdavo išstumiamas (viruso nebuvo randama naujai susiformavusiuose lapuose) (Lo'pez-Moya ir kt., 2000).

Tačiau toks metodas turi rimtą trūkumą, kelių skirtingų virusų infekcijos atveju buvo stebima hetero enkapsidacija (kitos rūšies virusas paimdavo transgeninį PPV CP savo kapsidės formavimui), o tai lemia potencialų pavojų, kad neplintantys su amara virusai dėl PPV CP savybių susijungti su amaro stileto vidiniu paviršiumi ims plisti. To bandoma išvengiama kuriant CP konstruktus su DAG motyvo arba regiono būtino kapsidės susirinkimui delecijomis (Jacquet ir k t., 1998)

1.2.11. PPV pritaikymas biotechnologijoje

Šiuo metu rodomas vis didesnis susidomėjimas augalų virusais, kaip biotechnologijos objektais, jie taikomi kaip vektoriai transgeninių baltymų raiškai augaluose, o taip pat vis daugiau dėmesio yra skiriama galimam jų panaudojimui kaip antigenų pateikimo sistemoms.

Egzistuoja dvi pagrindinės strategijos kuriant transgeninius augalus: branduolio genomo transformacija, ir jų ląstelių užkrėtimas chimeriniais augalų virusais.

Chimerinių virusų privalumai: galima gauti santykinai didelius tikslinio baltymo kiekius, jų ekspresija vyksta tik pasirinktu laiku, po inokuliacijos. Tikslinių sekų įklonavimas į virusinius genomus leidžia pasiekti geresnę baltymo ekspresiją nei atsitiktinis tikslinių sekų įsiterpimas į augalinės ląstelės branduolio genomą. Virusiniai vektoriai gali būti per trumpą laiką išbandyti eilėje skirtingų šeimininkų parenkant geriausią variantą tikslinio baltymo ekspresijai, be to viruso indukuojamas genų nutildymas gali būti panaudojamas augalo genų funkcinuose tyrimuose.

Slyvų raupų virusas pasižymi keletu sąvybių, darančių jį patrauklų vektorių kurimui. Didesnė genomų talpa būdinga spiralinę simetriją turintiems virusams (lyginant su iksoedriniais), vieno didelio poliproteino sintezė užtikrinanti tokį patį tikslinio baltymo kiekį kaip ir kitų viruso koduojamų baltymų, sąlyginai platus šeimininkų ratas kuris leidžia tikslinio baltymo sintezę vykdyti žoliniuose ir sumedėjusiuose augaluose bei tirti jų genų funkcijas

Dirbtinai susintetintų peptidų imunogeniškumas sustiprinamas sujungiant juos su didesnėmis molekulėmis, specifinių epitopų pateikimas ant augalų virusinių dalelių potencialiai veiksmingas būdas pagerinti antigeno pateikimą ir tuo pačiu sustiprinti imuninį atsaką į jį (Fitch ir kt., 1995). Kai kurias atvejais ši technologija gali pakeisti iš ląstelių kultūrų gaunamas vakcinas. Dažniausiai svetimi peptidai yra įterpiami į N galinę PPV CP geno sritį, vietoj 15 amino rūgščių deletuotų natūraliuose amarų neplatinamuose PPV – NAT mutantuose. Eksperimentai su šunu parvoviruso VP2 baltymo antigeninėmis savybėmis pasižyminčiu peptidų 6L15 buvo sėkmingi. Ilgą laiką propaguojant augaluose modifikuota seka išlieka stabili ir sukliamas efektyvus imuninis atsakas (pelėse, triušiuose) (Lo'pez-Moya ir kt., 2000; Pogue ir kt., 2002).

Ne visų peptidų sekos gali būti klonuotos į PPV NAT regioną, todėl intensyviai vykdoma paieška kitų, potencialiai jų ekspresijai tinkamų CP geno vietų.

Panaudojant PPV chimerinius virusus galima sukelti tiek nuo T tiek nuo B limfocitų priklausomą imuninį atsaką (Lo'pez-Moya ir kt., 2000).

II. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

Magistrinio darbo metu buvo atliktas tyrimas, kurio pagrindinis tikslas PPV izoliatų iš Ukrainos ir Lietuvos P3 – 6K1 genomio regiono sekų nustatymas ir palyginimas su duomenų bazėse prieinamomis to paties regiono sekomis.

Darbo metu buvo naudoti šie metodai: augalų indikatorių mechaninė inokuliacija, virusinės RNR išskyrimas iš užšaldytų audinių, vieno ir dviejų žingsnių atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandininė reakcija (AT-PGR), DNR išskyrimas iš agarozės gelio. Po sekoskaitos gautos sekos buvo analizuojamos panaudojant BLAST, ClustalX2 ir MEGA 4.1 kompiuterines programas.

2.1. Medžiagos

2.1.1. Tiriamieji PPV izoliatai

Visi tiriamieji PPV izoliatai buvo surinkti 2007 – 2008 metų laikotarpyje vykdant dvišalį Lietuvos ir Ukrainos projektą skirtą Slyvų raupų viruso tyrimui abiejose šalyse. Projekto metu buvo surinkta tiriamoji medžiaga, PPV virusas nustatytas iš viso 8 mėginiuose (Norkus ir kt., 2008). Iš jų šiam tyrimui atrinkti šeši mėginiai du iš Lietuvos ir keturi iš Ukrainos. Informacija apie tiriamųjų izoliatų radavietes pateikiama lentelėje 1.

1. lentelė. Tyrimams surinkti simptominiai augalai ir jų radavietės.

Radavietė	Izoliato pavadinimas
Lietuva	
Šakių rajonas, Patašynė	PPV1
Jonavos rajonas, Pėdžiai	PPV2
Ukraina	
Užgorodo apylinkės	PPV3
Užgorodo apylinkės	PPV4
Kijevo apylinkės, Novosilki gyvenvietė	PPV5
Kijevo apylinkės, Žuliani gyvenvietė	PPV6

2.1.2. Reagentai

β -merkaptioetanolis (ME)	<i>Serva</i>
TRIS (2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis)	<i>Roth</i>
DIECA (natrio dietilditiokarbamatas); EDTA (etilendiamintetraacetatas); KH_2PO_4 ; KCl; Na_2HPO_4 ; NaN_3 ;	<i>Merck</i>
RNazių inhibitorius; PCR buferiniai tirpalai: 10 mM dNTP mišinys, 10 \times Taq buferis, 25 mM MgCl_2	<i>MBI Fermentas</i>
Etanolis	<i>AB Sema</i>
Etidžio bromidas (EtBr)	<i>Boehringer Mannheim GmbH</i>
NaCl; agarozė	<i>Lachema</i>
Na_2SO_3 ; boro rūgštis; nikotinas	<i>Sigma</i>
Skystas azotas	<i>ELME-Messer</i>
Acto rūgštis	<i>Peaxim</i>

2.1.3. Oligonukleotidiniai pradmenys

Pradmenys buvo parinkti pasinaudojant literatūros šaltinį (Glasa ir kt., 2002;).

Pradmuo	Seka 5' - 3'	Tipas	Ilgis nt.	PGR produktas bp
PPV	TTA TCT CCA GGA RTT GGA GC	Ties.	20	836
	TTG AGT CAA ATG GRA CAG	Atv	22	
	TTG G			

2.1.4. Buferiai

10 \times TBE buferis	0,89 M TRIS; 0,89 M boro rūgštis; 0,02 M EDTA (pH 8,2-8,3)
10 \times TAE buferis	0,4 M TRIS; 0,2 M acto rūgštis; 0,01 M EDTA (pH 8,4)
Etidziobromido tirpalas	10 mg/ml etidziobromido
PPV inokulicijos buferis	2,5 g NaDIECA, 2 g Na_2SO_3 , 15 ml Nikotino, ištirpinti 1 L PBS, pH 7,2
Fosfatinis buferis (PBS) (pH 7,2-7,4)	1 L reikia: 8,0 g NaCl; 0,2 g KH_2PO_4 ; 1,15 g Na_2HPO_4 ; 0,2 g KCl; (0,2 g NaN_3)

2.1.5. Geliai

1-2 % agarozinis gelis	1-2 % agarozės TAE arba TBE buferiniame tirpale
------------------------	---

2.1.6. Rinkiniai

DNR gryninimui iš agarozės gelio: “DNA extraction kit”	<i>MBI Fermentas</i>
“QuickPrep total RNA extraction kit for the direct isolation of total RNA from most eukaryotic tissues or cells”	<i>Amersham Bioscience</i>

2.1.7. Fermentai

M-MuLV AT (Moloney pelių leukemijos viruso atvirkštinė transkriptazė),	<i>MBI Fermentas</i>
Rekombinantinė Taq polimerazė	

2.1.8. Molekulinės masės standartai ir dažai

GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, fragmentų dydžiai: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 100, 50 bp	<i>MBI Fermentas</i>
PCR produkto dažas “6× Loading Dye”	

2.2. Metodai

2.2.1. Augalų – indikatorių metodas

Norint užkrėsti augalą virusu, siūloma pasirinkti tokius indikatorinius augalus, kurie reaguos į tiriamą virusą bei kuriuose išryškės aiškiai pastebimi simptomai ir pažaidos. PPV atveju buvo pasirinktas sėjamasis žirnis (*P. Sativum*), nes jį užkrėtus ne tik pastebimi ryškūs ir tipiški simptomai, bet ir gaunama sisteminė viruso infekcija, ko pasekoje PPV yra padauginamas. Augalas indikatorius užkrečiamas infekuotų augalų sultimis iš šviežios, šaldytos arba liofilizuotos medžiagos. Užkrečiami jauni augalai 3-5 lapų stadijoje. Užkrėtimas mechaninis.

Užkrėtimo eiga:

1. Indikatorinių augalų lapai yra pabarstomi karborundu (abrazyvine medžiaga).
2. Porcelianiniame grūstuvėlyje sutrinami tiriamieji augalai, arba jų liofilinti lapai. Medžiaga trinama inokuliatu buferiniame tirpale.

3. Paraloninė kempinėle sumirkoma paruoštame inokuliume. Ją, prilaikant pincetu, sukamaisiais judesiais švelniai įtrinamas indikatorinio augalo lapo paviršius.
4. Sisteminiai infekcijos simptomai pasirodo praėjus savaitei ar daugiau po inokuliacijos (išryškėja lapų gyslos, stebima lapų chlorozė, virusu užsikrėtę augalai lyginant su sveikais pastebimai smulkesni). Lapai su aiškiais simptomais surenkami sveriami, fasuojami, žymimi ir padedami saugoti minusinėje temperatūroje arba liofilizuojami, t.y. užlydomi stiklinėse ampulėse.

2.2.2. Totalinės RNR išskyrimas

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

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

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

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

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

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

Rinkinio komponentai: ekstrakcijos buferis, turintis guanidino tiocianato ir N-lauril sarkozinato; LiCl tirpalas, ceziotrifluoracetatas (CsTFA).

Darbo eiga:

1. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 150 μL ekstrakcijos buferio ir po 3 μL ME.

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

2.2.3. Atvirkštinės transkripcijos polimerazinė grandininė reakcija

Daugelio augalų virusų genetinė medžiaga yra RNR, todėl polimerazinės grandininės reakcijos metodas yra modifikuojamas, pridedant papildomą reagentą atvirkštinę transkriptazę (AT). AT – fermentas, RNR paverčiantis DNR, kurią galima padauginti PGR metodu. PGR buvo naudojama amplifikuojant P3 – 6K1 viruso genomo sritį kuri vėliau buvo sekvenuojama. PPV P3 – 6K1 genomines srities 836 bp produktui amplifikuoti naudota vieno ir dviejų žingsnių PGR (su tais pačiais pradmenimis) (Glasa ir kt., 2002).

Dvieju žingsnių 836 bp fragmento amplifikacija:

Pirmiau gaunama cDNR, kuri po to buvo naudojama PGR. Iki RNR įvedimo mišinys ruošiamas bendrai, po kiekvieno reagento įpylimo būtina pamaišyti mašyklėje.

RNR paruošimas cDNR gavimui:

1. pilamas deprotonuotas vanduo + DEPC (6 μ L mėginiui).
2. pilamas 0,25 mM atvirkštinis pradmuo (2 μ L mėginiui).
3. mišinys išpilstomas į atskirus mėgintuvėlius.
4. įpilama RNR (po 4 μ L arba H₂O + DEPC vandens kontrolės atveju)
5. mėginiai nešami į termociklerį, naudojami temperatūriniai režimai:
 - 70 °C – 5 min;
 - 4 °C - ∞ .

cDNR gavimas:

Iki RNR įpylimo mišinys ruošiamas bendrai, po kiekvieno reagento įpylimo būtina pamaišyti mašyklėje.

1. pilamas 10 \times PGR buferis (jo imama 4 μ L mėginiui).
2. pilamas H₂O + DEPC (1,5 μ L mėginiui).
3. pilamas 10 mM dNTP (2 μ L mėginiui).
4. pilamas 40 u/ μ L ribonukleazių inhibitorius (0,5 μ L mėginiui).
5. pilama 200 u/ μ L atvirkštinė transkriptazė (1 μ L mėginiui).
6. paruoštas mišinys perpilstomas į mėgintuvėlius su anksčiau paruošta RNR.
7. vykdoma reakcija termocikleryje, pagal programą:
 - 42 °C – 60 min;
 - 70 °C – 10 min;
 - 4 °C - ∞ .

PGR:

Iki cDNR įpylimo mišinys ruošiamas bendrai, po kiekvieno reagento įpylimo būtina pamaišyti mašyklėje.

1. pilama H₂O + DEPC vanduo (26,75 μL mėginiui).
2. 10× PGR buferis (10 μL mėginiui).
3. pilamas 25 mM MgCl₂ (3 μL mėginiui).
4. pilamas 10 mM dNTP (1 μL).
5. pilami 0,25 mM tiesioginis ir atvirkštinis pradmenys (po 2 μL kiekvieno pradmens).
6. pilama 5u/μL Taq polimerazė (0,25 μL).
7. mišinys perpilstomas į atskirus mėgintuvėlius.
8. pilama cDNR (5 μL mėginiui).
9. toliau reakcija vykdoma termocikleryje, pagal programą
 - 94 °C – 10 min;
 - 35 ciklų:
 - 94 °C – 1 min;
 - 50 °C – 1 min;
 - 72 °C – 1min;
 - 72 °C – 10 min.
 - 4 °C - ∞.

Vieno žingsnio 836 bp fragmento amplifikacija:

1. į mėgintuvėlį pilamas deprotonuotas H₂O + DEPC (34,25 μl mėginiui).
2. pilamas 10 × PGR buferis (5 μL mėginiui)
3. į reakcijos mišinį pilamas 25 mM MgCl₂ tirpalas (3 μL mėginiui).
4. pilamas 10 mM dNTP tirpalas (1,25 μL mėginiui).
5. pilami 0,25 mM tiesioginis ir atvirkštinis pradmenys (2 μL kiekvieno mėginiui).
6. pilama 200u/μL atvirkštinė transkriptazė (0,2 μL mėginiui).
7. pilama 5u/μL Taq polimerazė (0,3 μL mėginiui).
8. PGR reakcijos mišinys išpilstomas į mėgintuvėlius kuriose vykdoma PGR reakcija.
9. pilama tiriami RNR (po 2 μL)
10. Mėgintuvėliai nešami į termociklerį. DNR kopijos sintetamos pagal programą:
 - 42 °C – 45 min;
 - 94 °C – 5 min;
 - 35 ciklų:
 - 94 °C – 1 min;
 - 50 °C – 1 min;

- 72 °C – 1 min s;
- 72 °C – 10 min.
- 4 °C - ∞.

2.2.4. DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR elektroforezė agarozės gelyje naudota keliems tikslams, RT – PCR reakcijos rezultatų vizualizavimui ir gautų PCR produktų gryninimui. Priklausomai nuo panaudojimo tikslo skyrėsi agarozės gelio koncentracija, rezultatų vizualizavimui naudoti didesnės koncentracijos (1-2%), o PCR produktų gryninimui mažiau agarozės savo sudėtyje turinčius (0,8%) gelius. Aukštesnė agarozės koncentracija leidžia geriau sukoncentruoti ir išskirstyti DNR, galima gauti geresnės kokybės forezių nuotraukas. Esant žemesnei agarozės koncentracijai paprasčiau tiriamus DNR fragmentus išgryninti iš gelio (mažiau agarozės mažiau priemaišų).

0,8 - 2% agarozės gelio paruošimas:

1. pilama 80 ml Tris-boratinio arba Tris-acetatinio buferinio tirpalo
2. dedama 0,64 – 1,6 g agarozės (priklausomai nuo pageidaujamos gelio koncentracijos)
3. tirplas maišomas kaitinant ant elektrinės viryklės kol agarozė pilnai ištirpsta.
4. karštas mišinys supilamas į horizontalią agarozės plokštelių formavimo formą, jam leidžiama pilnai sustingti.

Pavyzdžių paruošimas:

1. sumaišoma po 1 – 5 µl dažo ir po 5 – 25 µL PGR produkto (santykis 1:5).

Elektroforezės eiga:

1. Paruošiamas forezės aparatas (užpildomas TBE arba TAE buferiu).
2. į gelio šulinėlius suleidžiami mėginiai ir kontrolės (pirmi šulinėliai paliekami laisvi), suleidžiamas markeris (iš kraštų).
3. įjungiamas elektroforezės aparatas (palaikoma 60 – 80 V elektros srovės įtampa).
4. Elektroforezė leidžiama, kol dažas nukeliauja 2/3 gelio ilgio.

DNR žymėjimas etidžio bromidu:

1. gelis pamerkiamas į etidžio bromido tirpalą (1 µg/ml) ir laikomas jame apie 20 min.

2. gelis perkeliamas 15 min į distiliuotą vandenį, kad išiplautų su DNR nesusijungęs etidžio bromidas.
3. produktas analizuojamas transiluminatoriaus UV šviesoje. Produktai fiksuojami Bio-Rad GelDoc XR gelių dokumentavimo sistema.

2.2.5. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio

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

1. Pridedama surišimo buferio (santykis 1:3) ir inkubuojama 55 °C temperatūroje 5 minutes, kol gelis visiškai ištirpsta.
2. Dedama 5 µL silicio pudros, inkubuojama 55 °C temperatūroje 5 minutes (esant didelėms DNR koncentracijoms inkubaciją galima prailginti iki 15 minučių).
3. Mėgintuvėliai centrifuguojami 14000 apsisukimų per minutę greičiu 5 sekundes, pašalinamas supernatantas
4. Pridedama 500 µL plovimo buferio, silicio milteiai visiškai susenduojami jame po to mėgintuvėliai centrifuguojami 14000 apsisukimų per minutę greičiu 5 sekundes, pašalinamas supernatantas. Procedūra kartojama tris kartus.
5. Silicio milteliai resuspenduojami dejonizuotame vandenyje, arba TE buferyje ir inkubuojami 55 °C temperatūroje 5 minutes. Silicio pudros pašalinimui mėgintuvėlius centrifuguojame 14000 apsisukimų per minutę greičiu 30 sekundžių, gautas supernatantas (kuriame yra ištirpusi DNR) perkeliamas į naują mėgintuvėlį.

2.2.6. Nukleotidinių sekų kompiuterinė analizė

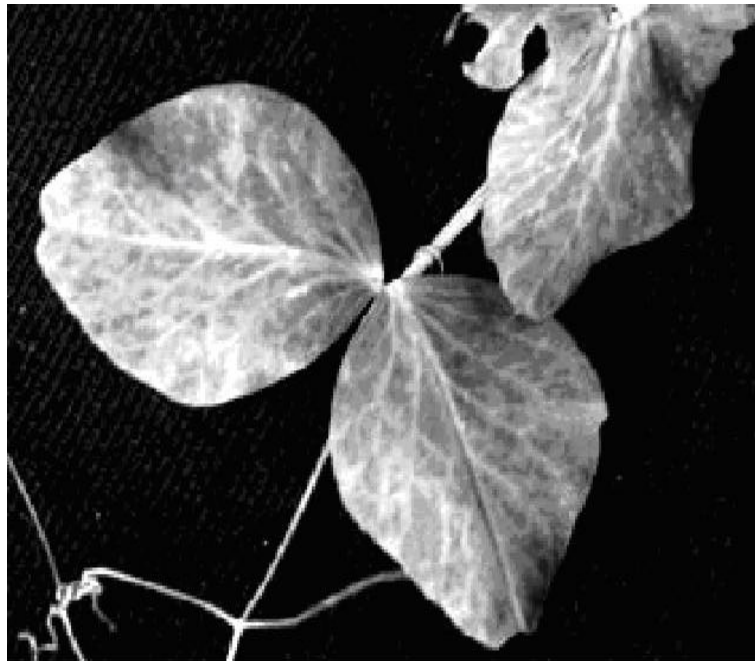
PCR produktų nukleotidų sekas nustatė „Macrogen“ (Korėja). Sekoskaitos metodu gautos sekos, naudojant „Sequence editor“ programą prieinamą internete (<http://www.fr33.net/seqedit.php>) buvo apjungiamos į vientisą seką, kad persidengtų tarpusavyje, kas yra reikalinga rezultatų tikslumui.

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

III. EKSPERIMENTŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Augalų – indikatorių metodas

Augalai indikatoriai buvo užkrėsti PPV izoliatais iš Ukranos ir Lietuvos (Norkus ir kt., 2008). Indikatoriniai augalai buvo užkrečiami mechaniškai, pasirenkant jauną augalą 3-5 lapų stadijoje. Inokuliacija buvo atliekama liofilizuotais augalų audinių ekstraktais inokuliacijos buferyje. Praėjus maždaug savaitei nuo užkrėtimo augale indikatoriuje (*P. sativum*) pasireiškė tipiški sisteminės PPV infekcijos požymiai (lapo gyslų išryškėjimas, margligė, chlorozė, augalo augimo tempo sulėtėjimas). Tipiški PPV infekcijos požymiai žirnyje pavaizduoti 7 paveiksle.



7 pav. PPV sisteminės infekcijos simptomai žirnyje (*P. sativum*)

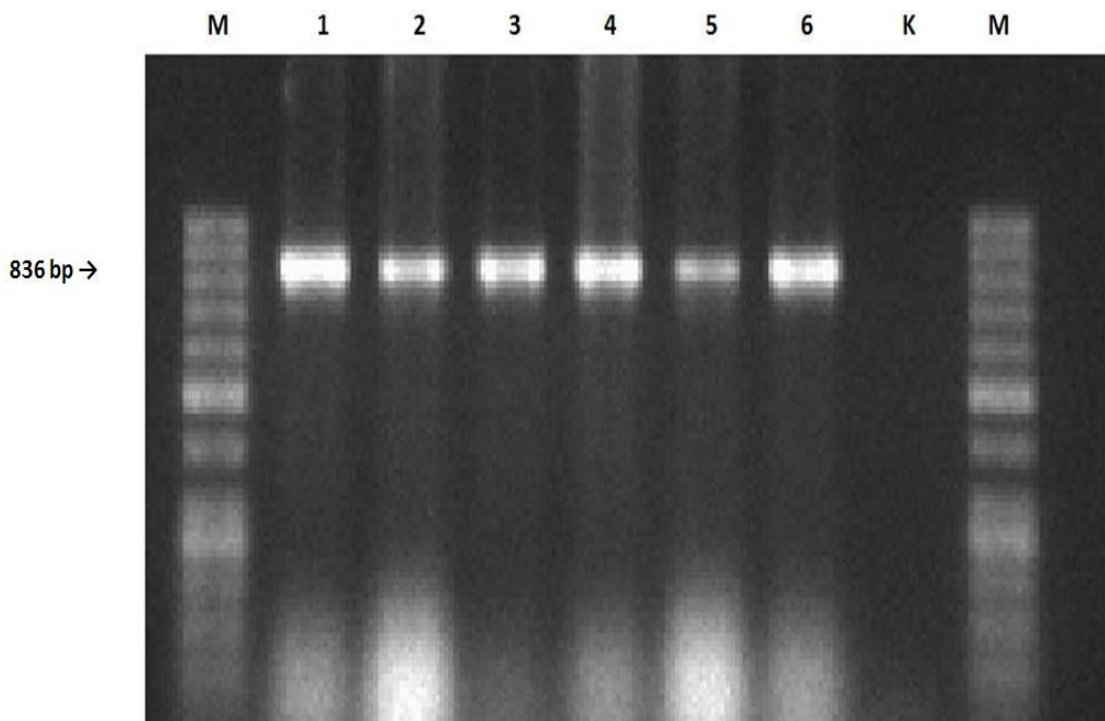
Dėl sisteminio infekcijos pobūdžio žirnis puikiai tinka viruso kultivavimui (padauginimui). Praėjus apytiksliai dviem savaitėms po inokuliacijos lapai su aiškiais simptomais surenkami, sveriami, fasuojami, žymimi ir padedami saugoti minusinėje temperatūroje arba liofilizuojami.

3.2. PPV P3 – 6K1 genominės srities 836 bp produkto amplifikacija

Daugumos augalų virusų nukleorūgštis yra RNR, todėl yra naudojamas modifikuotas PGR metodas – su atvirkštine transkriptaze.

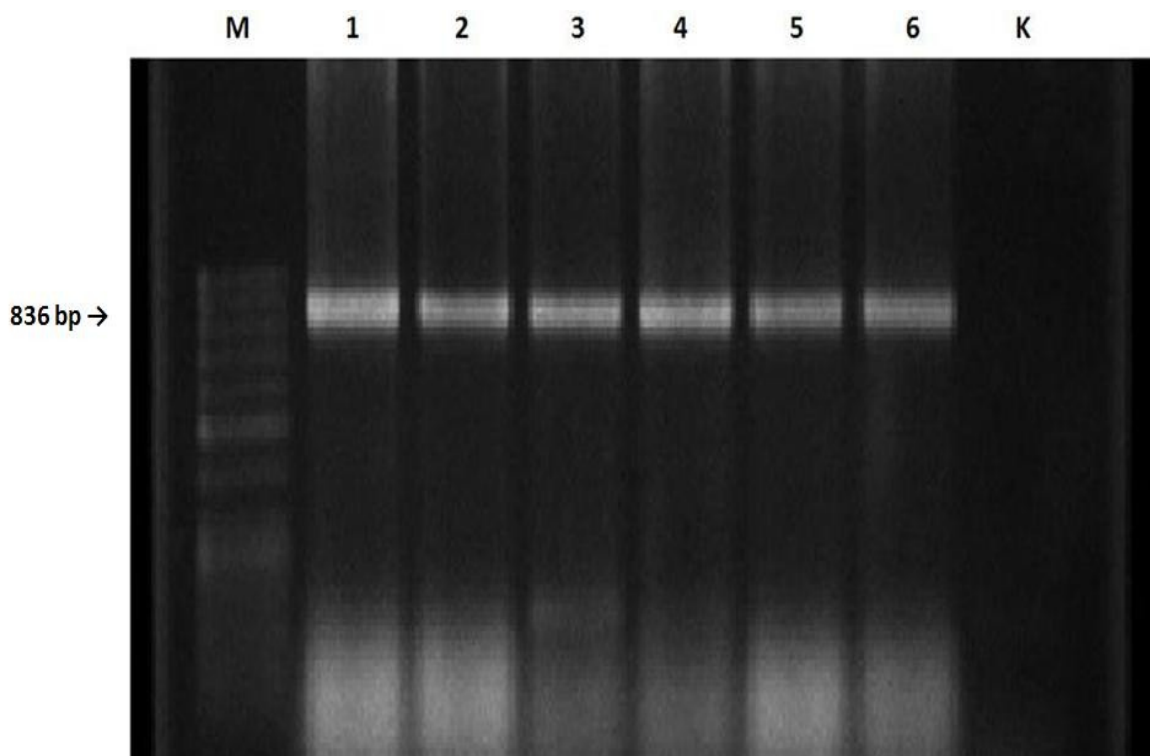
Virusinė RNR išskirta iš PPV izoliatais iš Lietuvos ir Ukrainos užkrėstų žirnių (*P. sativum*), kuriuose pasireiškė virusui būdingi simptomai (chlorozė, lapo gyslų išryškėjimas, sulėtėjęs augalo augimas), iš jų išskirta totalinė RNR panaudojant “QuickPrep total RNA extraction kit for the direct isolation of total RNA from most eukaryotic tissues or cells”. Taip pat buvo naudojama vandens kontrolė. 836 bp produktas buvo amplifikuojamas atliekant vieno ir dviejų žingsnių AT – PGR, kad būtų užtikrinta pakankamas produkto kiekis sekoskaitai dviejų PGR reakcijų produktai po DNR gryninimo stadijos buvo apjungti.

8 paveikslas iliustruoja produktus gautus vykdant vieno žingsnio AT-PGR. Iš pateikto paveikslo matosi, kad visais 6 atvejais gaunami specifiniai PPV P3 – 6K1 genominiai sričiai 836 bp produktai. Kurie vėliau buvo išgryninti ir panaudoti tolimesniuose tyrimuose.



8 pav. Vieno žingsnio AT-PGR rezultatai 1% agarozės gelyje. M takeliuose markeris – GeneRuler 50 bp, 1-2 takeliai – pavyzdžiai iš Lietuvos, 3-6 – pavyzdžiai iš Ukrainos, K – vandens kontrolė.

9 paveikslas iliustruoja produktus gautus vykdant dvejų žingsnių AT-PGR, 863 bp produkto susidarymas stebimas visuose šešiuose pavyzdžiuose, nors susidaro mažesnis produkto kiekis, tačiau sumažėja nespecifiškumą. Gauti produktai vėliau buvo išgryninti ir apjungus su atitinkamais vieno žingsnio AT-PGR produktais pateikti sekoskaitai.

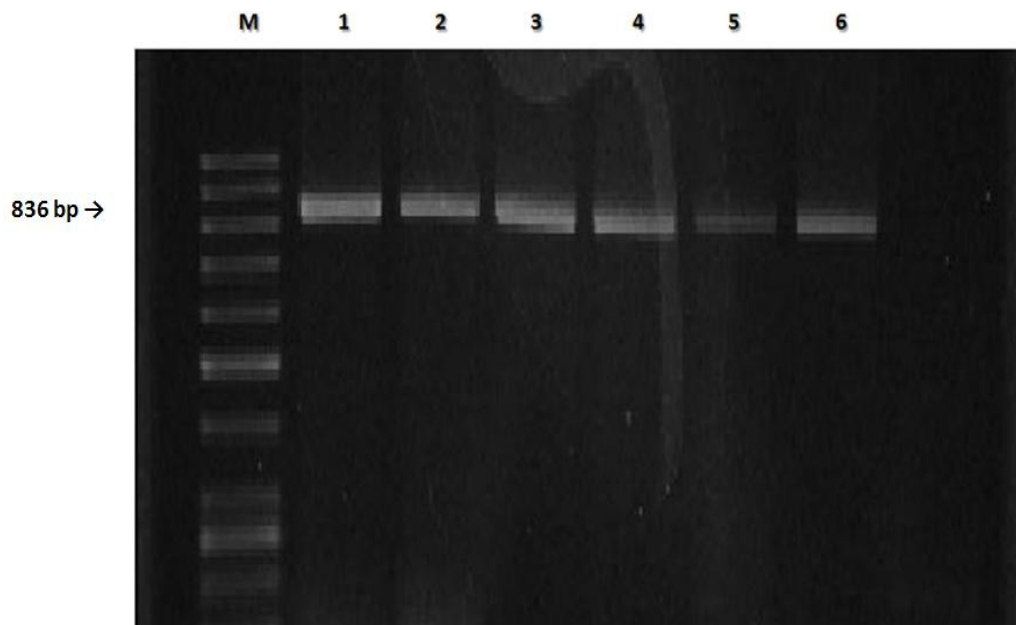


9 pav. Dvejų žingsnių AT-PGR rezultatai 2% agarozės gelyje. M takeliuose markeris – GeneRuler 50 bp, 1-2 takeliai – pavyzdžiai iš Lietuvos, 3- 6 – pavyzdžiai iš Ukrainos, K – vandens kontrolė.

3.3. DNR fragmentų išskyrimas iš agarozės gelio

Vieno ir dviejų žingsnių AT-PGR metu gauti PPV P3 – 6K1 genomo sričiai specifiniai 863 bp ilgio produktai išgryninti vykdant jų elektroforezę 0,8% agarozės gelyje iš kurio reikiami fragmentai buvo išpjaunami ir išvalomi panaudojant “DNA extraction kit” (*MBI Fermentas*). Gauti švarūs 863 bp fragmentai vėliau buvo apjungti (kad būtų užtikrintas reikiamas produkto kiekis) ir pateikti sekoskaitai.

10 paveikslas iliustruoja 863 bp produktus po DNR valymo. Produktas stebimas visuose šešiuose tiriamuose pavyzdžiuose, nėra jokių nespecifiškumų.



10 pav. PPV P3 – 6K1 geno sričiai specifiniai 836 bp produktai po valymo “DNA extraction kit” 2% poliakrilamidiniame gelyje. M takelyje – GeneRuler 50 bp, 1-2 takeliai – pavyzdžiai iš Lietuvos 3-6 takeliai – pavyzdžiai Ukrainos.

3.4. PPV P3 – 6K1 genominės srities 836 bp produkto nukleotidinių sekų kompiuterinė analizė

Norint gauti daugiau informacijos apie turimus PPV izoliatus iš Lietuvos ir Ukrainos (Norkus ir kt., 2008), panaudojant specifinius pradmenis (Glasa ir kt., 2002) buvo amplifikuotas PPV geno 5' galo P3 – 6K1 sričiai komplementarus 836 bp produktas. Nors iki šiol daugiausia mokslininkų tyrinėjančių Slyvų raupų virusą dėmesio buvo skiriama 3' PPV geno galo tyrimams, ypač apvalkalo (CP) baltymo sričiai, tačiau pastaruoju metu atsirandant vis daugiau duomenų apie PPV viruso 5' galo sekų reikšmę infekcijos simptomų pasireiškimui, jos eigai ir viruso prisitaikymui prie augalo šeimininko. Gautas 836 bazių porų produktas apima galinę P3 geno dalį, visą 6K1 geną ir CI geno pradžią. Turimi duomenys leidžia teigti apie šio fragmento svarbą PPV infekcijos simptomų pasireiškimui, o taip pat identifikuoja jį kaip vieną iš veiksnių apsrėdžiantį PPV izoliatų priklausomybę dviem pagrindinėms slyvų raupų viruso padermėms (PPV – M ir PPV – D) (Saenz ir kt., 2000).

P3 – 6K1 srities padauginimui buvo naudojama viruso RNR, išskirta iš užkrėstų indikatoriinių augalų, mechaniškai inokuliuotų PPV (Lietuvoje ir Ukrainoje išskirti izoliatai).

Šešioms izoliatams (Lietuvoje išskirtiems PPV1, PPV2 ir Ukrainoje išskirtiems PPV3, PPV4, PPV5, PPV6) buvo nustatyta P3 – 6K1 srities nukleotidinė seka. Izoliatų PPV2, PPV4, PPV5 ir PPV6 nukleotidinė seka buvo pilnai nustatyta, o kitų dviejų: PPV1, PPV3 tik dalinai. Tiriamo regiono koduojama 278 aminorūgščių seka buvo išvesta iš gautų nukleotidų sekų. Gautas nukleotidų, bei su kitomis sekomis, gautomis iš genų banko duomenų bazės (2. lentelė).

P3 – 6K1 regiono sekų identiškumas tarp izoliatų iš Ukrainos ir Lietuvos svyravo nuo 95 iki 98 %. Tarpusavyje panašiausi buvo PPV3, PPV4 ir PPV5 izoliatai, jų sekų identiškumas siekė 98 %.

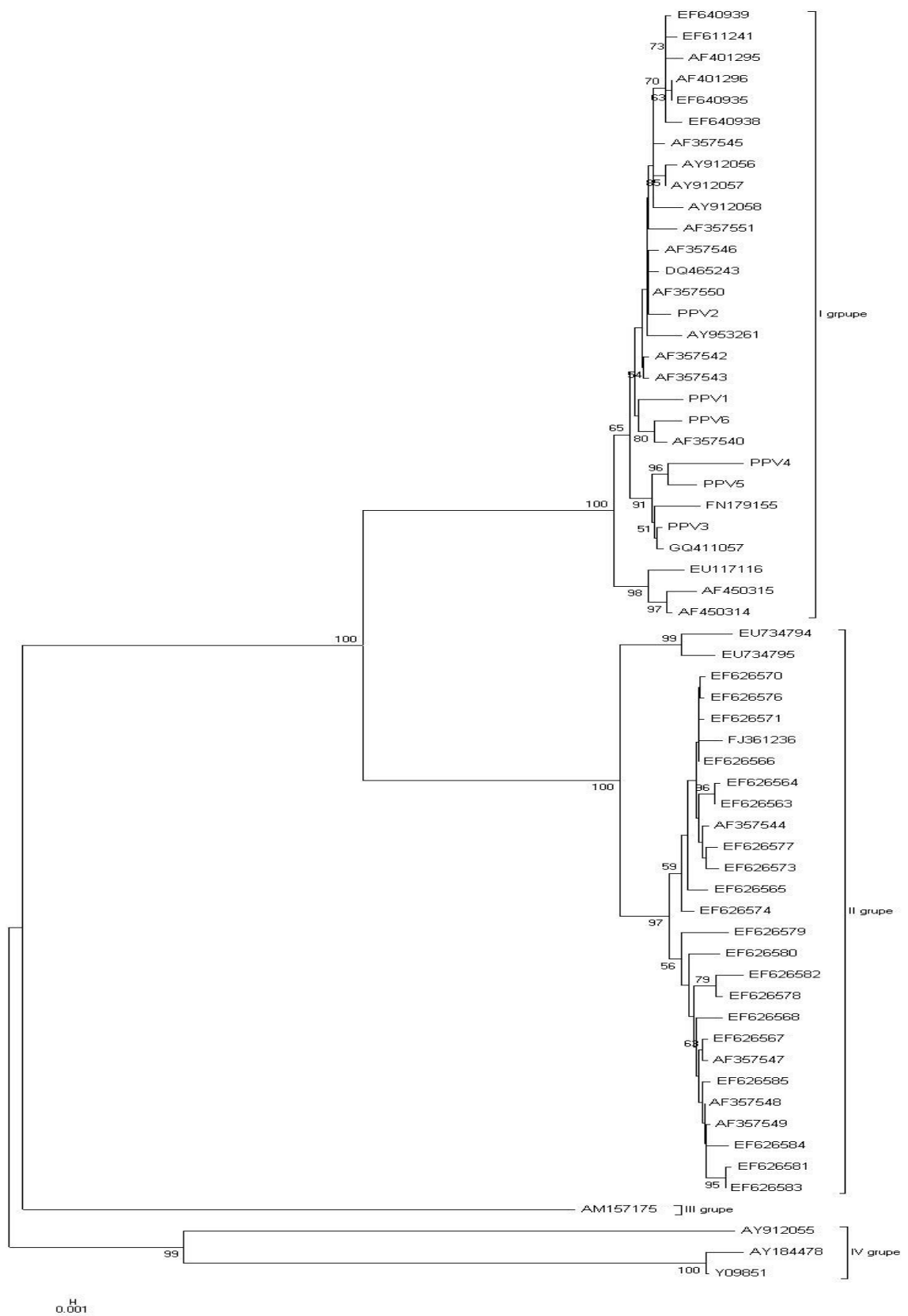
2 lentelė. Įvairių šalių PPV izoliatų P3 – 6K1 srities sekų numeriai genų banko duomenų bazėje

Šalis	Izoliatas	Sekos numeris	Padermė	Šaltinis
Baltarusija				
	Blr001	GQ411057	D	Neskelbti duomenys
Bulgaria				
	BG5	EF626563	M	Neskelbti duomenys
	BG6	EF626564	M	Neskelbti duomenys
Čekija				
	CZ1	EF626566	M	Neskelbti duomenys
	CZ2	EF626565	M	Neskelbti duomenys
Egiptas				
	PPVEA	AM157175	EA	Myrta ir kt., 2006
Graikija				
	GR1	EF626580	M	Neskelbti duomenys
	GR2	EF626568	M	Neskelbti duomenys
	GR3	EF626579	M	Neskelbti duomenys
Italija				
	IT1	EF626581	M	Neskelbti duomenys
	IT2	EF626582	M	Neskelbti duomenys
	IT3	EF626583	M	Neskelbti duomenys
JAV				
	PENN1	AF401295	D	Neskelbti duomenys
	PENN2	AF401296	D	Neskelbti duomenys
	PENN3	EF611241	D	Neskelbti duomenys
	PENN4	DQ465243	D	Wallis ir kt., 2007
	PEEN7	EF640935	D	Neskelbti duomenys
	PENN10	EF640938	D	Neskelbti duomenys
	PENN12	EF640939	D	Neskelbti duomenys
Kanada				
	48-922	AY912058	D	James ir kt., 2005
	Cnd1	AY953261	D	Neskelbti duomenys
	Fantasia	AY912056	D	James ir kt., 2005
	Vulcan	AY912057	D	James ir kt., 2005
	W	AY912055	W	James ir kt., 2005
Kipras				
	CY1	EF626584	M	Neskelbti duomenys
	CY2	EF626585	M	Neskelbti duomenys

Šalis	Izoliatas	Sekos numeris	Padermė	Šaltinis
Kroatija	Porec	FJ361236	M	Neskelbti duomenys
Lenkija	J4c	EU117116	Rec	Neskelbti duomenys
Prancūzija	85.001	AF357550	D	Glasa ir kt., 2002
	91.003	AF357548	M	Glasa ir kt., 2002
	91.006	AF357549	M	Glasa ir kt., 2002
	92.011	AF357545	D	Glasa ir kt., 2002
	93.080	AF357546	D	Glasa ir kt., 2002
	94.055	AF357551	D	Glasa ir kt., 2002
	94.061	AF357547	M	Glasa ir kt., 2002
	FR2	EF626567	M	Neskelbti duomenys
	FR3	EF626568	M	Neskelbti duomenys
Serbija ir Juodkalnija	RS1	EF626570	M	Neskelbti duomenys
	RS2	EF626571	M	Neskelbti duomenys
	RS4	EF626573	M	Neskelbti duomenys
	RS5	EF626574	M	Neskelbti duomenys
Slovakija	BIII/2	AF357540	D	Glasa ir kt., 2002
	BOJ-3	AF357542	D	Glasa ir kt., 2002
	BOR-1	AF357543	D	Glasa ir kt., 2002
	KRN-1	AF450314	Rec	Glasa ir kt., 2002
	MYV-1	AF450315	Rec	Glasa ir kt., 2002
	SK1	EF626576	M	Neskelbti duomenys
	SK2	EF626577	M	Neskelbti duomenys
	VAR2	AF357544	M	Glasa ir kt., 2002
Turkija	AbTk	EU734794	Rec(T)	Ulubas Serce ir kt., 2009
	Ap28	EU734795	Rec(T)	Ulubas Serce ir kt., 2009
Vengrija	Soskut1	FN179155	D	Neskelbti duomenys
Nepateikta	SoC	AY184478	C	Fanigliulo ir kt., 2003
	SvC	Y09851	C	Fanigliulo ir kt., 2003

D - PPV-D, M PPV-M, EA - PPV-EA, C - PPV-C, W - PPV-W, Rec - PPV-Rec padermės; (Rec(T) – netipiški rekombinantiniai izoliatai išskirti Turkijoje skirtingai nei tipišku PPV-Rec padermės atstovų jų rekombinacija vyko HC-Pro gene 5' genomo sritis (PPV-Recpadermėje rekombinacijavyko Nib – CP genų sandūroje 3' genomo srityje) (Ulubas Serce ir kt., 2009).

Filogenetinė P3 – 6K1 regiono analizė parodė, kad visi PPV izoliatai išsidėsto į keturias pagrindines grupes, apimančias atitinkamai PPV – D ir PPV – Rec (I grupė), PPV – Rec(T) ir PPV – M (II grupė), PPV – EA (III grupė), PPV – W ir PPV – C (IV grupė) padermes (11; 12 pav).



11 pav. Filogenetinis PPV RNR koduojamo P3 – 6K1 genomo regiono medis, sukonstruotas ClustalX ir MEGA 4.1 programomis, naudojant artimiausių grupių apjungimo metodą pagal 1000 medžių statistinio patikimumo analizę. Medžio šakų pavadinimai nurodo jų sekos numerį duomenų bazėje. (Sekų palyginimams naudotų izoliatų pavadinimai, tipas ir kimės šalis nurodyti 2. lentelėje). Tirti izoliati – PPV1, PPV2, PPV3, PPV4, PPV5, PPV6. Medžio skalė rodo filogenetinio panašumo indeksą (nurodytos tik ≥ 50 reikšmės), (brūkšnys – 0,001 aminorūgščių pasikeitimų vienoje padėtyje).

. Visi mūsų tyrinėti izoliatai priklauso pirmosios grupės PPV – D padermei. Tirtų PPV izoliatų grupavimasis su visa eile geografiškai vienas nuo kito nutolusių izoliatų (kartu su izoliatais aptiktais, JAV, Prancūzijoje, Vengrijoje, Baltarusijoje) leidžia teigti, kad į Lietuvą ir Ukrainą jie pateko su sodinamąja medžiaga. Lietuviški PPV1, PPV2 ir Ukrainietiškas PPV6 izoliatai – giminingesni izoliatams iš vakarų valstybių, o Ukrainieiški PPV3, PPV4, PPV5 izoliatai grupavosi kartu su Baltarusijoje ir Vengrijoje išskirtais izoliatais (12 pav).

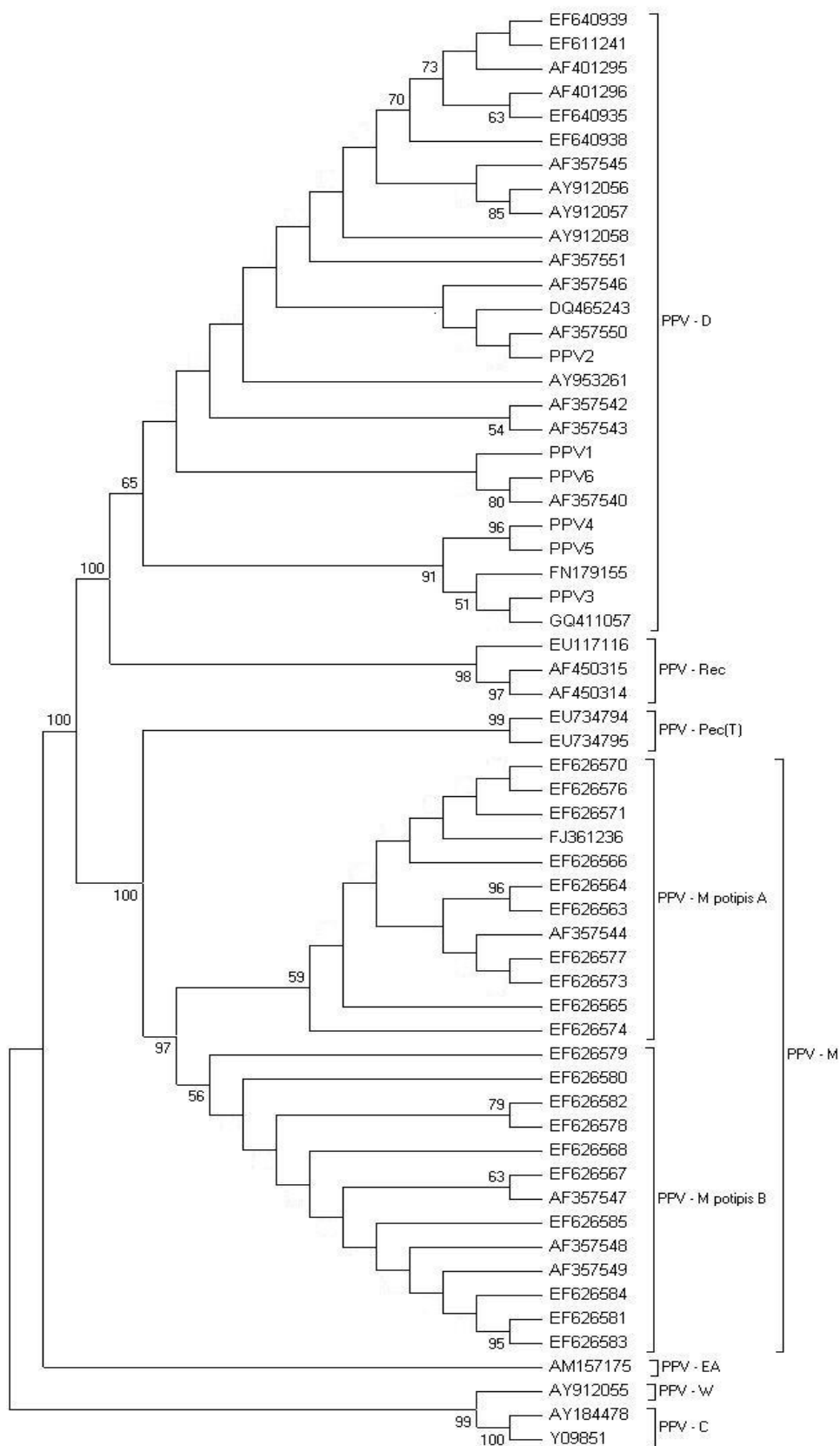
PPV – M padermei priklausantys izoliatai grupavosi sudarydami du atskirus potipius (12 pav), gautas rezultatas atitinka literatūros duomenis apie dviejų PPV – M tipų egzistavimą (Myrta ir kt., 2001) ir jų geografinį paplitimą, antrosios PPV – M grupės paplitimas skirtingose klimatinėse zonose iš dalies leidžia teigti apie prekybos svarbą PPV viruso evoliucijoje. Visi PPV – M pirmajam potipiui priklausantys izoliatai – kilę iš buvusių Varšuvos pakto šalių, o PPV – M antrajam potipiui priklausantys izoliatai aptikti senosiose ES narėse. Ilgus metus tarp šių dviejų Europos geopolitinių zonų nevykusi aktyvi prekyba ir leido susidaryti dviem atskiroms PPV – M subgrupėms. Tokių potipių nebuvimas PPV – D padermėje gali būti paaiškintas silpnesniais infekcijos simptomais užsikrėtusiuose augaluose, tai leidžia greitesnį PPV – D plitimą su sodinamąja medžiaga, tuo pačiu ir galimybę atskiriems izoliatams keistis paveldima medžiaga (to paties augalo šeimininko kryžminio užkrėtimo atveju).

PPV rekombinantiniai izoliatai į dvi grupes pagal savo 5' galinių sekų artimumą PPV – M arba PPV – D padermėms, priklausomai nuo rekombinacijos taško, PPV – Rec padarmės izoliatai – artimesni PPV – D padermei nes jų rekombinacijos taškas yra 3' galinėje geno dalyje (jo sekos artimesnės PPV – M), o PPV – Rec(T) izoliatų rekombinacija vyko 5' galinėje geno dalyje, todėl jų šio regiono sekos artimesnės PPV – M sekoms.

PPV – EA išsiskyrė į visiškai atskirą grupę (12 pav) iš ko galima spręsti apie savarankišką šios padermės susiformavimą.

PPV- W ir PPV – C izoliatai priklausė IV PPV virusų grupei (11 pav), skirtumai tarp PPV – C izoliatų išskirtų iš užkrėstų trešnės ir slyvos vaismedžių – nežymūs (12 pav).

Kompiuterinė PPV P3 – 6K1 genominės srities analizė pasižymėjo pakankama skiriamąja geba leidžiančia atskirti visas šiuo metu žinomas PPV padermes.



12 pav. Filogenetinis PPV RNR koduojamo P3 – 6K1 geno regiono medis, sukonstruotas ClustalX ir MEGA 4.1 programomis, naudojant artimiausių grupių apjungimo metodą pagal 1000 medžių statistinio patikimumo analizę (pateikiama tik topologija). Medžio šakų pavadinimai nurodo jų sekos numerį duomenų bazėje. (Sekų palyginimams naudotų izoliatų pavadinimai, tipas ir kimės šalis nurodyti 2. lentelėje). Tirti izoliati – PPV1, PPV2, PPV3, PPV4, PPV5, PPV6. Medžio skalė rodo filogenetinio panašumo indeksą (nurodytos tik ≥ 50 reikšmės).

IŠVADOS

1. Izoliatai iš Lietuvos ir Ukrainos padauginti indikatoriniame augale (*P. sativum*).
2. Panaudojant PPV P3 – 6K1 genominiam regionui specifinius pradmenis jo sekos buvo padaugintos atliekant vieno ir dviejų žingsnių AT – PGR, gauti 836 bp DNR fragmentai išvalyti nuo priemaišų ir pateikti sekoskaitai.
3. Pagal P3 – 6K1 genomio regiono sekas visi tirti izoliatai priklausė PPV – D padermei. Sekų panašumas lyginant tarpusavyje ir su duomenų bazėse prieinamomis PPV – D izoliatų sekomis svyravo nuo 95 iki 98 procentų.
4. Filogenetinė tiriama izoliatų P3 – 6K1 genomio regiono sekų analizė patvirtino hipotezę, kad virusas į Lietuvą ir Ukrainą pateko su sodinamąja medžiaga.

Darbą atliko: Tomas Norkus

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

SANTRAUKA

Slyvų raupų virusas, priklausantis *Potyviridae* (bulvių Y) virusų šeimai, *Potyvirus* genčiai, sukelia vieną pavojingiausių kaulavaisių ligų „šarką“. Per paskutinį šimtmetį virusas plačiai paplito po pasaulį, sukeldamas rimtus ekonominius nuostolius. Virusą nepersistentiniu būdu platina amarai, taip pat jis plinta su sodinamąja medžiaga ir vegetatyviškai dauginant kaulavaisius. 2007 metais Lietuvoje ir Ukrainoje atlikto slyvų raupų viruso tyrimo metu virusas buvo aptiktas aštuoniuose tirtuose mėginiuose, keturiems iš jų nustatyta PPV – D slyvų raupų viruso padermė (Norkus ir kt., 2008). Pastaruoju metu atsirandant vis daugiau duomenų apie PPV viruso 5' galines sekas, tuo pačiu ir P3 – 6K1 regioną, jo įtaką PPV infekcijos eigai, šeimininkų ratui, plitimo pobūdžiui (Saenz ir kt., 2000; Glasa ir kt., 2002), atrodo logiška atlikti detalesnius turimų PPV izoliatų P3 – 6K1 genomio regiono tyrimus, juo labiau, kad šiuo metu duomenų apie Lietuvos ir Ukrainos PPV virusų P3 – 6K1 regioną nėra.

Magistro darbo tikslas buvo atlikti Lietuvos ir Ukrainos PPV izoliatų P3 – 6K1 genomio regiono sekų analizę, palyginant juos tarpusavyje ir su kitų PPV izoliatų sekomis, prieinamomis duomenų bazėse.

Gauti rezultatai patvirtina sėkmingą 836 bp P3 – 6K1 PPV viruso genomio regiono amplifikaciją. Pagal šį regioną visi tiriami izoliatai priklauso PPV – D padermei (panšumas su PPV – D padermės izoliatų sekomis prieinamomis duomenų bazėse siekė 95 – 98 procentus). Tiriamų Lietuviškų PPV izoliatų sekų panašumas su vakarų Europos izoliatų sekomis, o Ukrainietiškų su rytų ir vakarų Europos izoliatų sekomis leidžia teigti, kad virusas į Lietuvą ir Ukrainą su sodinamąja medžiaga pateko skirtingais keliais, iš rytų ir vakarų Europos valstybių.

SUMMARY

ANALYSIS of PLUM POX VIRUS P3-6K1 GENOMIC REGION SEQUENCES in UKRAINIAN and LITHUANIAN ISOLATES

Plum pox virus (PPV) is a member of genus *Potyvirus*, family *Potyviridae* and is the causal agent of the devastating stone fruit disease “sharka”. During the last century the virus became widespread in the world causing serious economical impact in number of countries. PPV spreads in nonpersistent manner by aphids, with infected plant propagating material and with vegetative stone fruit propagation when source of grafts is infected with PPV. 2007 year study conducted in Lithuania and Ukraine detected PPV in eight samples, in four of them PPV - D plum pox virus strain was determined (Norkus, etc., 2008). Recently, the more data on PPV virus 5' end sequences, and P3 – 6K1 region is appearing (its influence on the course PPV infection, hosts, spreading nature) (Saenz, etc., 2000; Glasa, etc., 2002), and it seems logical to collect more data of P3 – 6K1 genomic region in Lithuanian and Ukraine isolates.

The purpose of this work was to analyse Lithuanian and Ukraine PPV isolates P3 – 6K1 genomic region sequences comparing them with each other and with other PPV isolates sequences, available in databases.

The obtained results confirm successful 836 bp P3 – 6K1 PPV virus genomic region amplification. According to this region all tested isolates is dependent to PPV - D strain (similarity with PPV - D strain isolates sequences available in databases at 95 - 98 percentage). The Lithuanian PPV isolates sequences similarity with western European isolates sequences, and Ukrainian with eastern and western European isolates sequences suggests that the virus spread to Lithuania and Ukraine with infected plant propagating material was contained in two different ways from east and west European countries.

PADĖKA

Už suteiktą galimybę rašyti magistro darbą virusologijos srityje ir pagalbą jį rašant norėčiau padėkoti Gamtos Tyrimų Centro Fitovirusų laboratorijos vadovui habil dr. Juozui Staniuliui ir doktorantei Marijai Žižytei.

PUBLIKACIJOS

Norkus T, Staniulis J, Žižytė M, Melnyk M, Yusko L, Snihur H, Budzanivska I, Polischu 2008. Molecular identification of plum pox virus isolates from Lithuania and Ukraine. *Zemdirbyste – Agriculture* 95: 277-285

Staniulis J, Žižytė M, Norkus T 2008. Incidence of plum pox virus in Lithuania and Ukraine. “*Taras Shevchenko’ Kyiv National Universiti’ Scientific Bulletin, Biology Series*”. 51: 50-54

LITERATŪROS SARAŠAS

1. Anindya R, Chittori S, Savithri HS, 2005. Tyrosine 66 of *Peper vein banding virus* genome – linked protein is uridylylated by RNA – dependent RNA polymerase. *Virology* 336: 154 – 162
2. Anindya R, Savithri HS, 2004. Potyviral NIa proteinase, a proteinase with novel deoxyribonuclease activity. *Journal of Biological Chemistry* 279: 32159 – 32169.
3. Ballut L, Drucker M, Pugniere M, Cambon F, Blanc S, Roquet F, Candresse T, Schmid HP, Nicolas P, Le Gall O, Badaoui S, 2005. HcPro, a multifunctional protein encoded by a plant RNA virus, targets the 20S proteasome and affects its enzymic activities. *Journal of General Virology* 86: 2595 – 3122.
4. Blanc S, Ammar ED, Garcia - Lampasona S, Dolja VV, Lave C, Baker J, Pirone, TP, 1998. Mutations in the *potyvirus* helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *Journal of General Virology* 79: 3119 – 3122.
5. Blanc S, Lopez – Moya JJ, Wang RY, Garcia – Lampasona, Thornbury DW, Pirone TP, 1997. A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* 231: 141 – 147.
6. Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW, Baulcombe DC 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal* 17: 1157 – 1162.
7. Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs A, Watson L, Zurcher EJ, 1999. *Plum pox potyvirus*. *Plant Viruses Online*. <http://biology.anu.edu.au>
8. Candresse T, Cambra M, Dallot S, Lanneau M, Asensio M, Gorris T, Revers F, Macquaire G, Olmos A, Boscia D, Quiot J B, Dunez J. 1998, Comparison of Monoclonal Antibodies and Polymerase Chain Reaction Assays for the Typing of Isolates Belonging to the D and M Serotypes of *Plum Pox Potyvirus*. *Virology*. 88: 198 – 204.
9. Daros JA, Carrington JC, 1997. RNA binding activity of NIa proteinase of tobacco etch virus. *Virology* 237: 327 – 336.
10. Daros JA, Schaad M, Carrington JC, 1999. Functional analysis of the interaction between VPg – proteinase (NIa) and RNR polymerase (NIb) of *tobacco etch potyvirus*, using conditional and supresor mutants. *Journal of Virology* 73: 8732 – 8740.
11. Dragoljub D, Richard E, Malina T. Handbook of Plant Virus Diseases. JAV. 1999. 348 – 354.
12. Dunez J, Šutic D, 1988. *Plum pox virus* (PPV). *European Handbook Pl. Dis.*, Blackwell Sci. Publ., London, 44 – 46.
13. Fanigliulo A, Comes S, Maiss E, Piazzolla P, Crescenzi, A, 2003. The complete nucleotide sequence of *Plum pox virus* isolates from sweet (PPV-SwC) and sour (PPV-SoC) cherry and their taxonomic relationships within the species. *Archives of Virology* 148: 2137-2153.
14. Fernandez – Fernandez MR, Camafeita E, Bonay P, Mendez E, Albar JP, Garcia JA, 2002. The capsid protein of a plant single – stranded RNA virus is modified by O- linked N – acetylglucosamine. *Journal of Biological Chemistry* 90: 467 – 473.
15. Fernandez A, Guo HS, Saenz P, Simon – Buela L, Gomez de Cedron M, Garcia JA, 1997. The motif V of *plum pox virus* CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic Acids Research* 25: 4474- 4480.
16. Fitchen J, Beachy RN, Hein MB, 1995. Plant virusexpressing hybrid coat protein with added murine epitope elicits autoantibody response. *Vaccine* 13, 1051–1057

17. Glasa M, Marie – Jeanne V, Labonne G, Subr Z, K'udela O, Quiot JB, 2002. A natural population of recombinant *Plum pox virus* is viable and competitive under field conditions. *European Journal of Plant Pathology* 108: 843–853.
18. Glasa M, Marie – Jeanne V, Moury B, Kudela O, Quiot J – B, 2002. Molecular variability of the P3-6K1 genomic region among geographically and biologically distinct isolates of plum pox virus. *Archives of Virology* 147: 563 – 575.
19. Glasa M, Palkovics L, Kominek P, Labonne G, Pittnerova S, Kudela O, Candresse T, Subr Z, 2002. Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of *Plum pox virus* (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup *Journal of General Virology*. 85: 2671–2681.
20. Glasa M, Paunovic S, Jevremovic D, Myrta A, Pittnerov'a S, Candresse T, 2005. Analysis of recombinant *Plum pox virus* (PPV) isolates from Serbia confirms genetic homogeneity and supports a regional origin for the PPV-Rec subgroup. *Archives of Virology* 150: 2051–2060
21. Gonzalez- Jara P, Tenllado F, Martinez- Garcia B, Atencio FA, Barajas D, Vargas M, Diaz- Ruiz J, Diaz- Ruiz JR, 2004. Host – dependent differences during synergistic infection by *Potyvirus*es with potato virus X. *Molecular Plant Pathology* 5: 29 – 35.
22. Govier DA, Kassanis B, Pirone TP 1977. Partial purification and characterization of the potato virus Y helper component. *Virology* 78: 306 – 314.
23. Guo DY, Rajamaki ML, Saarma M, Valkonen JPT, 2001. Towards a protein interaction of *potyvirus*es: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two- hybrid system. *Journal of General Virology* 82: 935 – 939.
24. Hampton, RE, Hopkins, DL, Nye TG, 1966. Biochemical effects of tobacco etch virus infection on tobacco leaf tissue—I.: Protein synthesis by isolated chloroplasts. *Phytochemistry* 5: 1181 – 1185.
25. Herrera G, Sepulveda P, Madariaga M, 1998. Survey of sharka disease (*plum pox virus*) on stone fruit trees in chile. *Proc 17 Int. Symp. on Fruit Tree Virus Diseases*, 393 – 399.
26. Hong Y, Hunt AG, 1996. RNA polymerase activity catalyzed by a *potyvirus* – encoded RNA – dependent RNA polymerase. *Virology* 226: 146 – 151.
27. Hull R, Editor 2002. Matthews' Plant Virology. Academic Press. 33 – 35.
28. Ivanov KI, Puustinen P, Mertis A, Saarma M, Makinen K, 2001. Phosphorylation down – regulates the RNA binding function of the coat protein of *potato virus A*. *Journal of Biological Chemistry* 276: 13530 – 13540.
29. Jacquet C, Ravelonandro M, Bachelier, JC, Dunez, J, 1998. High resistance to plum pox virus (PPV) in transgenic plants containing modified and truncated forms of PPV coat protein gene *Transgenic Reserche* 7: 29 – 39
30. James D, Glasa M, 2006. Causal agent of sharka disease: new and emerging events associated with *Plum pox virus* characterization. *OEPP/EPPO Bulletin* 36: 247 – 250
31. James D, Varga A, 2005. Nucleotide sequence analysis of Plum pox virus isolate W3174: evidence of a new strain *Virus Research*. 110: 143-150
32. James D, Varga A, Thompson D, Hayes S, 2003. Detection of a new and unusual isolate of *plum pox virus* in plum (*Prunus domestica*). *Plant disease*. 87: 9.
33. Jeckeviciene E, Staniulis J, 2003. Investigation of incidence of plum pox virus in Lithuania. *Horticulture and Vegetable Growing*. 22: 201
34. Kasschau KD, Xie ZX, Allen E, Lave C, Chapman EJ, Krizan KA, Carrington JC, 2003. P1/HC- Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNR function. *Developmental Cell* 4: 205 – 217.
35. Khan J A, J Dijkstra Editors. Handbook of Plant Virology. Food Products Press. New York•London•Oxford. 2007. 253 – 257.

36. Klein PG, Klein RR, Rodriguez- Cerezo E, Hunt A, Shaw JG, 1994. Mutational analysis of tobacco vein mottling virus genome. *Virology* 204: 759 – 796.
37. Kurstak Eduard (editor), 1981. Handbook of plant virus infections comparative diagnosis. North- Holland Biomedical Press. 733 – 799.
38. Lansac M, Chalack L, Cardona B, Sorbier A, 1998. In vitro inoculation of prunus species with *plum pox potyvirus*. *Proc 17 Int. Symp. on Fruit Tree Virus Diseases*, 445 – 459.
39. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.
40. Lopez L, Urzainqui A, Dominguez E, Garcia JA, 2001. Identification of an N-terminal domain of the *plum pox virus* CI RNA helicase involved in self interaction in a yeast two- hybrid system. *Journal of General Virology* 82: 677 - 686.
41. Lopez-Moya JJ, Fernandez- Fernandez MR, Cambra M, Garcia JA, 2000. Biotechnological aspects of *plum pox virus*. *Journal of biotechnology* 76: 121 – 136.
42. Maia IG, Haenni A- L, Bernadi F, 1996. Potyviral HC - Pro: a multifunctional protein. *Journal of General Virology* 77: 1335 – 1341.
43. Martin MT, Garcia JA, Cervera MT, Goldbach RW, Lent J, 1992. Intracellular localization of three non – structural *plum pox potyvirus* proteins by immunogold labeling. *Virus Research* 25: 201 – 211.
44. Matthews R, (Editor), 1992. Fundamentals of plant virology. Academic Press, Inc. JAV. 125 – 129.
45. Merits A, Guo DY, Saarma M 1998. VPg, coat protein and five nonstructural proteins of *potato A potyvirus* binding RNR in a sequence - unspecific maner. *Journal of General Virology* 79: 3123 – 3127.
46. Mertis A, Guo DY, Jarvekulg L, Saarma M, 1999. Biochemical and genetic evidence for interactions between *potato A potyvirus* – encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replicacion complex. *Virology* 263: 15 – 22.
47. Milosevic TM, Glisic IP, Milosevic NT, Glisic IS, 2009. Plum pox virus as a stress factor in the vegetative growth, fruit growth and yield of plum (*Prunus domestica*) cv. ‘Cacanska Rodna’. *European Journal of Plant Pathology* 126: 73 - 79
48. Myrta A, Boscia D, Potere O, Kolber M, Nemeth M, Di Terlizzi B, Cambra M, Savino V, 2001. Existence of two serological subclusters of *Plum pox virus*, strain M. *European Journal of Plant Pathology*. 107: 845 – 848.
49. Myrta A, Varga A, James D, 2006. The complete genome sequence of an El Amar isolate of *plum pox virus* (PPV) and its phylogenetic relationship to other PPV strains. *Archives of Virology*. 151: 1189 – 1198.
50. Neema Agrawal PV, Dasaradhi, Asif Mohmmed, Pawan Malhotra, Raj K. Bhatnagar, and Sunil K. Mukherjee, 2003. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and molecular biology reviews* 67: 657 – 685
51. Nemchinov L, Hadidi A, Maiss E, Cambra M, Candresse T, Damsteegt V, 1996. Sour cherry strain of *plum pox potyvirus* (PPV): molecular and serological evidence for a new subgroup of PPV strains. *Molecular Plant Pathology*. 86: 1215 – 1221.
52. Norkus T, Staniulis J, Žižytė M, Melnyk M, Yusko L, Snihur H, Budzanivska I, Polischu 2008. Molecular identification of plum pox virus isolates from Lithuania and Ukraine. *Zemdirbyste – Agriculture* 95: 277-285
53. Pandolfini T, Molesini B, Avesani L, Spena A, Polverari A, 2003. Expression of self-complementary hairpin RNA under the control of the rolC promoter confers systemic disease resistance to *plum pox virus* without preventing local infection. *BMC Biotechnology* 2003. (<http://www.biomedcentral.com/1472-6750/3/7>).
54. Piskun NI. Plum pox virus in Ukraine, 1969. *Plant protection* 6: 54

55. Plant Viruses Online duomenų bazė internete. Descriptions and Lists from the VIDE Database. Sukurta 1996. Adresas: <http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr068.htm>
56. Poggi Pollini C, Giunchedi L, Bissani R, 1997. Specific detection of D- and M- isolates of plum pox virus by immunoenzymatic determination of PCR products. *Journal of Virological Methods*. 67: 127 – 133
57. Pogue P, Lindbo JA, Garger SJ, Fitzmaurice WP, 2002. MAKING AN ALLY FROM AN ENEMY: Plant Virology and the New Agriculture Gregory. *Annual Review of Phytopathology* 40: 45 - 74
58. Rankovic M, 1976. Protein fragments of Sharka virus and its use in agar gel – diffusion test. *III Kongres Mikrobiologa Jugoslavie, Bled*. 178 – 179.
59. Ratunshnyak LK, 2003. Distribution of plum pox virus in Ukraine. *Notes of agrarian science of southern region* 4: 156
60. Riechmann JL, Cerveta MT, Garcia JA, 1995. Processing of the plum pox virus polyprotein at the P3- 6K1 junction is not required for virus viability. *Journal of General Virology* 76: 951 – 956.
61. Ross JP, 1970. Effect of Temperature on Mottling of Soybean Seed Caused by Soybean Mosaic Virus. *Phytopathology* 60: 1798 – 1800.
62. Salenz P, Cervera MT, Dallot S, Quiot L, Quiot JB, Riechmann J, Garcia JA, 2000. Identification of a pathogenicity determinant of *Plum pox virus* in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3M6K1. *Journal of General Virology* 81: 557 - 566
63. Salvador B, Garcia JA, Simon – Mateo, 2006. Causal agent of smarka disease: *Plum pox virus* genome and function of gene products. *Bulletin OEPP/EPPO* 36: 229 – 238.
64. Schaad MC, Haldeman – Cahill R, Cronin S, Carrington JC, 1996. Analysis of the VPg – proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: Effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *Journal of Virology* 70: 7039 – 7048.
65. Schaad MC, Jensen PE, Carrington JC, 1997. Formation of plant RNA virus replication complexes on the membranes: role of an endoplasmic reticulum- targeted viral protein. *EMBO Journal* 16: 4049 – 4059.
66. Serçe CU, Candresse T, Svanella-Dumas L, Krizbai L, Gazel M, Çağlayan K, 2009. Further characterization of a new recombinant group of *Plum pox virus* isolates, PPV-T, found in orchards in the Ankara province of Turkey. *Virus research* 142: 121 - 126
67. Sertkaya G, Ulubas C, Çağlayan K 2003. Detection and characterization of *plum pox potyvirus* (PPV) by DAS – ELISA and RT – PCR / RFLP Analysis in Turkey. *Turk. J. Agric. For.* 27: 213 – 220.
68. Staniulis J, Stankienė J, Sasnauskas A, 1998. First report of Sharka disease caused by *plum pox virus* in Lithuania. *Plant Disease* 82: 1405.
69. Szemes M, Kalman M, Myrta A, Boscia D, Nemeth M, Kolber M, Dorgai L, 2000. Integrated RT- PCR/nested PCR diagnosis for differentiating between subgroups of *plum pox virus*. *Journal of Virological Methods*. 92: 165 – 167
70. Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
71. The quarantine state of territory of Ukraine is on January, 1, 2006, 2006. Quarantine and plant protection 4: 1
72. Tu, JC, Ford RE, Grace CR, 1970. Effect of Fertilizers and Rates of Application on Incidence of Soybean Diseases in Northern Alabama. *Phytopathology* 60: 1653
73. Urcuqui-Inchima S, Haenni AN, Bernardi F, 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions *Virus Research* 74: 157–175

74. Verchot J, Koonin EV, Carrington JC, 1991. The 35- kDa protein from the N-terminus of a potyviral polyprotein functions as a third virus- encoded proteinase. *Virology* 185: 527 – 535.
75. Wallis CM, Stone AL, Sherman DJ, Damsteegt VD, Gildow FE, WL Schneider, 2007. Adaptation of plum pox virus to a herbaceous host (*Pisum sativum*). *General Virology* 88: 2839 - 2845
76. Weintraub M, Agrawal HO, Rageli HWJ, 1973. Cytoplasmic and nuclear inclusions in leaf cells infected with *Datura* shoestring virus (DSV) *Canadian Journal of Botany* 51: 855 – 861