

Fitoplazmomis ir viroidais infekuotos trešnės (*Prunus avium* L.) *in vitro* kultūra

Gražina STANIENĖ¹, Vidmantas STANYS¹, Jurgita VINSKIENĖ¹,
Rokas ABRAITIS², Rasa JOMANTIENĖ³, Deividas VALIŪNAS³,
Asta ABRAITIENĖ²

¹Lietuvos sodininkystės ir daržininkystės institutas
Kauno g. 30, Babtai, Kauno r. sav.
El. paštas: g.staniene@lsdi.lt

²Biotechnologijos institutas
V. A. Graičiūno g. 8, Vilnius

³Botanikos institutas
Žaliųjų Ežerų g. 49, Vilnius

Santrauka

Siekiant iširti fitoplazmų bei viroidų paplitimą Lietuvos trešnyuose, nustatyti užkrėstų augalų *in vitro* kultūros indukavimo galimybes ir įvertinti jos užkrėstumo patogenais lygį, augalų sveikatingumo būklė vertinta įvairiuose soduose ekspedicijų metu Alytaus, Kauno, Šiaulių ir Vilniaus apskrityse. Paimtos 15 vizualiai sergančių ir 5 be ligos požymių trešnių medžių šakos. Molekulinės biologijos metodais įvertinti simptominiai augalai, iš jų eksplantų indukuota *in vitro* kultūra. Praėjus metams nuo eksplantų sodinimo *in vitro*, buvo įvertintas fitoplazmų bei viroidų paplitimas mikroūgliuose ir nustatyti fitoplazmų bei viroidų pasiskirstymo *in vitro* kultūroje dėsningumai. Užkrėstuose medžiuose buvo aptikti labai panašaus dydžio žiedinės RNR fragmentai. RFLP ir rDNR sekų analizė parodė, kad trešnėse aptiktos fitoplazmos priklausė dviem grupėms. Nustatytos 16SrIII-T ir 16SrI-B pogrupių fitoplazmos. Iširta, kad fitoplazmomis arba viroidais užsikrėtę augalai yra smarkiai pažeisti ir kitų mikroorganizmų (bakterijų bei grybų). *In vitro* kultūrai indukuoti tinkamiausi intensyviausiai augantys ūgliai. *In vitro* kultūra iš dalies eliminuoja fitoplazmas, bet nepašalina viroidų. Analizuojamos tirtų patogenų eliminavimo galimybės, naudojant *in vitro* kultūrą.

Reikšminiai žodžiai: fitoplazmos, viroidai, *Prunus avium* L., molekulinė identifikacija, *in vitro*.

Įvadas

Augalai kenčia nuo įvairių ligų sukėlėjų, mažinančių jų produktyvumą. Vienos mažiausiai tyrinėtų augalų ligų sukėlėjų grupių yra viroidai ir fitoplazmos. Bulvių viroidas PSTVd trečiaisiais ligos metais jų šakniagumbių derlių sumažina net iki 97 % /Pfannenstiel, Slack, 1980/, pomidorų vaisių – 40–45 % /Kryczynski et al., 1988/, gadina produkcijos prekinę išvaizdą. Europoje kaulavaisius augalus infekuojantys apynio žemaūgiškumo (HSVd) ir latentinis persiko mozaikiškumo (PLMVd) viroidai buvo aptikti Italijoje, Rumunijoje, Prancūzijoje, Ispanijoje, Austrijoje ir kitur /Ambrós et al., 1995;

Astruc et al., 1996; Faggioli et al., 1997; Loreti et al., 1998; Desvignes et al., 1999/. Fitoplazmos taip pat padaro nemažai žalos, sumažindamos augalų derlių ir pablogindamos kokybę /Lee et al., 1998; Sinclair, Griffiths, 2000/. Europoje fitoplazmų bei viroidų sukeltas kaulavaisių (*Prunus* spp.), serbentų (*Ribes* spp.), bulvių (*Solanum* sp.) ligas stebėjo ir tyrė daug autorių /Davies, Adams, 2000; Pollini et al., 2001; Pallas et al., 2003/. Lietuvoje fitoplazmos aptiktos varpiniuose augaluose /Urbanavičienė et al., 2008/, kriaušėse, vyšniose, obelyse /Valiūnas et al., 2004; Jomantiene, Davis, 2005/, o viroidai, jų sukeltos ligos ir pasekmės iki šiol netirtos.

Fitoplazmų bei viroidų eliminavimo iš augalų metodai turi būti paprasti ir daryti minimalų poveikį ląstelių augimui. Gali būti taikomos dvi skirtingos, jungiančios įvairius metodus, strategijos: patogenų eliminavimas augale *in vivo* (i) ir augalo gydymas *in vitro* (ii) sistemose. Kadangi fitoplazmos neturi ląstelės sienelės, jos yra atsparios antibiotikams, sąveikaujantiems su ląstelės sienele. Fitoplazmas naikina alternatyvaus veikimo (nesąveikaujantys su ląstelės sienele) antibiotikai. Nustatyta, kad antibiotikų tirpalo injekcijos į infekuoto augalo audinius sumažino fitoplazmų sukeltus simptomus, bet visiškai jo neišgydė /Chalak et al., 2005/. Lapų ir dirvožemio veikimas antibiotikais taip pat nedavė teigiamo efekto. Fitoplazmas iš augalų galima pašalinti taikant termoterapiją /Converse, George, 1987/. Termoterapijai *in vivo* reikia per daug techninių sąnaudų. Perspektyvus ir santykinai gana paprastas būdas iš audinių pašalinti fitoplazmas yra termoterapija *in vitro*, ją derinant su antibiotikų naudojimu /Dai et al., 1997/. Viroidų sukeltamų ligų kontroliavimo būdai mažai tyrinėti, bet perspektyviausia laikoma termoterapija ir šalčio terapija meristemų kultūroje *in vitro* /Paduch-Cichal, Kryczynski, 2008/.

Darbo tikslas – ištirti fitoplazmų bei viroidų buvimą Lietuvos trešnyuose, nustatyti užkrėstų augalų *in vitro* kultūros indukavimo galimybes ir įvertinti jos užkrėstumo patogenais lygį.

Sąlygos ir metodai

Tyrimo objektas. Augalų sveikatingumo būklė vertinta 2007–2008 m. įvairiuose trešnių soduose ekspedicijų metu Alytaus, Kauno, Šiaulių ir Vilniaus apskrityse. Paimtos 15 vizualiai sergančių ir 5 be ligos požymių trešnių šakos.

Fitoplazmų nustatymas. Iš simptominių augalų bendroji DNR buvo išskirta iš 30 mg medžiagos, pagal instrukciją panaudojus „Fermento“ gnominės DNR skyrimo rinkinį. Polimerazinei grandininei reakcijai atlikti naudotas termocikleris „Eppendorf mastercycler personal“ bei PGR rinkinys („Fermentas“, Lietuva, *Taq* DNR polimerazė, 10 x PGR buferis, 2mM dNTP mišinys). Į 50 µl reakcijos mišinį buvo dedama po 20 pM kiekvieno pradmens, 1 µl rekombinantinės *Taq* DNR polimerazės, 0,25 mM kiekvieno dNTP. PGR reakcijos sąlygos: 1) 2 min +94 °C (lydymasis), 2) 1 min +94 °C, 3) 2 min +55 °C (pradmenų prilydymas su matricine DNR), 4) 3 min +72 °C (pradmenų ilginimas), 5) 20 min +72 °C. 2–4 ciklai kartoti 35 kartus. Po ciklinės reakcijos mišinys atvėsintas iki +4 °C.

Fitoplazmoms 16S rDNR pagausinti vykdyta lizdinė polimerazinė grandininė reakcija, kurioje naudotos dvi fitoplazmoms universalios pradmenų poros. Pirmosios reakcijos metu su P1/P7 pradmenų pora pagausintas 1 800 bp DNR fragmentas, į kurio sudėtį įėjo 16S rRNR geno dalis, tarpgeninis rajonas ir 23S 5' galas. Naudojant kitą pradmenų porą R16F2n/R16R2, pagausinta 1 200 bp dydžio 16S rDNR. Pirmajam PGR

produktui pagausinti naudota pradmenų pora: P1 5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3', P7 5'-CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3' /Deng, Hiruki, 1991/. Lizdinio PGR produktui (16S rDNR) pagausinti naudota kita pradmenų pora: R16F2n 5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3', R16R2 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3' /Gundersen, Lee, 1996; Lee et al., 1998/.

Lizdinės PGR produktai analizuoti elektroforeziškai 1 % agarozės gelyje, naudojant TA (Tris-acetatinį) buferinį tirpalą, nudažyti etidžio bromidu ir stebėti ultravioletinėje šviesoje UV transliuminatoriumi. Naudotas DNR dydžio žymuo *GeneRuler™* 100 kb DNA Ladder Plus („Fermentas“).

Viroidų nustatymas. RNR išskirta iš 800 mg lapų pavyzdžių pagal modifikuotą TRIR (*Total RNA Isolation Reagent*, „Thermo Scientific“, JAV) reagento pakuotės instrukciją. Vienintelis jos papildymas buvo RNR valymas ličio chloridu, leidęs atskirti didelės ir mažos (taip pat ir viroidų) molekulinės masės RNR molekules. Distiliuotame vandenyje (200 µl) ištirpinta RNR 30 min palaikyta ant ledo, įpilta 200 µl 4M LiCl ir 4 val. inkubuota +4 °C temperatūroje. Tolesnės procedūros vykdytos pagal instrukciją.

RT-PGR metodika. Paruošti du mišiniai: Nr. 1 – 3,75 µl dH₂O, 3,0 µl pradmens-1 (50 pmol µl), 3,0 µl pradmens-2 (50 pmol µl), 9,75 µl (1 reakcija) ir Nr. 2 – 0,5 µl fermentų mišinio, 12,5 µl 2 x PCR *Master Mix*, 1,25 µl RT *Enhancer*, 14,25 µl (1 reakcija). Mišinys Nr. 1 sumaišytas su RNR (9,75 µl mišinio Nr. 1 + 1 µl RNR), 2 min inkubuotas termocikleryje +95 °C temperatūroje, tuomet temperatūra sumažinta iki +4 °C ir laikyta, kol buvo paruoštas mišinys Nr. 2. Tuomet mėgintuvėliai išimti iš termociklerio, trumpai centrifuguoti ir įpilta po 14,25 µl mišinio Nr. 2. Tolesnės reakcijos sąlygos: 30 min +50 °C, 2 min +95 °C, (20 s +95 °C, 45 s +56 °C, 1 min +72 °C) x 35, 5 min +72 °C, +4 °C – neapibrėžtą laiką. Naudoti pradmenys: *Apple dimple fruit* viroidui – specifiniai pradmenys ADFVdf (GACTAAAAGAAAA TCAGCAGGTG), ADFVdr (CTCGACTAGCGGCAGGAAGC); *Apple fruit crinkle* viroidui – specifiniai pradmenys AFCVdf (TGGTGACTCGTCGTCGACGAAG), AFCVdr (TCGACTAGCGGGACCCAGCTAG); *Apple scar skin* viroidui – specifiniai pradmenys ASSVdf (CCGTGCGGTTCTGTGGTT), ASSVdr (GCCGCTGCG TCAAAGAAAAAG); *Pear blister canker* viroidui – specifiniai pradmenys PBCVdf (CCTAGGGGCTTCTCGGCTCGTCGTC), PBCVdr (CTTCGGCGGTGCTCGGGT TGT). Visi pradmenys sukurti autorių taikant *Lasergene 7.2* programinio paketo programą *PrimerSelect* („DNASar Inc.“, JAV).

RT-PGR produktai analizuoti elektroforezę atliekant poliakrilamidiniame gelyje. Į kiekvieną 5 % poliakrilamidinio gelio šulinėlį buvo įpilta po 10 µl mišinio (3 µl RT-PGR produkto ir 7 µl skiesto dažo (#R0611, „Fermentas“). Elektroforezė vykdyta kambario temperatūros TBE (Tris-boratiname) buferiniame tirpale, esant 120 V įtampos elektros srovei. Geliai nudažyti etidžio bromidu.

In vitro kultūra. Iš atrinktų augalų paimti eksplantai (ūglio segmentai su vienu pumpuru) kultūrai *in vitro* indukuoti. Nepavykus indukuoti kultūros *in vitro* vasaros metu ir bandymus kartojant pavasarį, eksplantai imti nuo sprogstančių šakelių. Prieš sodinimą į mėgintuvėlius eksplantai 10 min sterilinti sublimatu ir tris kartus perplauti steriliu vandeniu. Sodinti į MS /Murashige, Skoog, 1962/ maitinamąją terpę, pridėjus 30 g l sacharozės, po 0,5 mg l vitaminų (tiamino, piridoksino, nikotino rūgšties), 0,75 mg l 6-benzilaminopurino (BAP).

Mėgintuvėliai su pasodintais eksplantais pernešti į kultivavimo kambarį, kuriame palaikyta +24–25 °C temperatūra ir 16 val. fotoperiodas. Eksplantai kas mėnesį persodinti į šviežią maitinamąją terpę.

Infekcijos procentas bei eksplantų augimas registruotas po dviejų savaitių, vieno, dviejų ir penkių mėnesių. Eksplantai nuo sumedėjusių augalų ilgiausių (>5 pumpurai), vidutinių (3–5 pumpurai) ir trumpų (1–2 pumpurai) šakelių vertinti atskirai.

Duomenys apdoroti statistinės analizės programa *Selekcija* /Tarakanovas, 1999/.

Rezultatai ir jų aptarimas

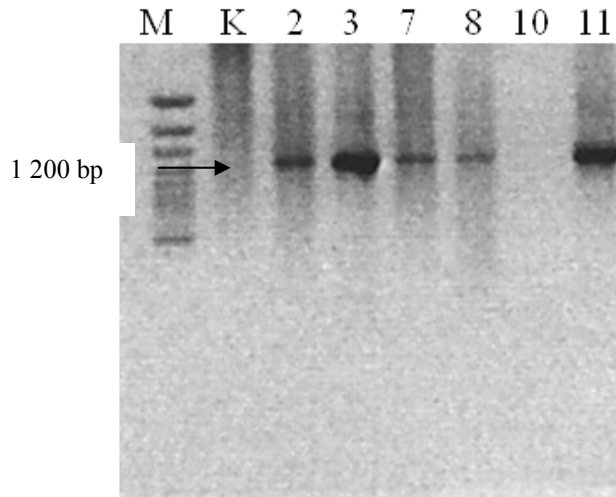
Visuose augaluose, atrinktuose pagal galimus ligų simptomus (lapų, metūglių stiebo pageltimas, šakų proliferacija, lapų sumažėjimas, paraudimas, sutankėjimas, apvytymas), buvo aptikti ligų sukėlėjai – fitoplazmos arba viroidai. Kontroliniuose be ligų simptomų augaluose patogenų nenustatyta (1 lentelė). Tirti augalai pagal patogenų sudėtį suskirstyti į keturias grupes: augalai, užkrėsti fitoplazmomis (Nr. 1–5, Nr. 7–8, Nr. 11, Nr. 13, Nr. 16–17), augalai, užkrėsti viroidais (Nr. 9–10), augalai, užkrėsti viroidais bei fitoplazmomis (Nr. 6, Nr. 14), ir augalai, kuriuose nenustatyta nei viroidų, nei fitoplazmų (Nr. 18–22).

1 lentelė. Augalų užsikrėtimas fitoplazmomis ir viroidais

Table 1. Plant infection with phytoplasmas and viroids

Augalo ID <i>ID of a plant</i>	Fitoplazma <i>Phytoplasma</i>	Viroidas <i>Viroid</i>
Trešinė Nr. 1 / <i>Sweet cherry No. 1</i>	16SrIII-T pogrupis / <i>sub-group</i>	–
Trešinė Nr. 2 / <i>Sweet cherry No. 2</i>	16SrIII-T pogrupis / <i>sub-group</i>	–
Trešinė Nr. 3 / <i>Sweet cherry No. 3</i>	16SrIII-T pogrupis / <i>sub-group</i>	–
Trešinė Nr. 4 / <i>Sweet cherry No. 4</i>	16SrIII-T pogrupis / <i>sub-group</i>	–
Trešinė Nr. 5 / <i>Sweet cherry No. 5</i>	16SrIII-T pogrupis / <i>sub-group</i>	–
Trešinė Nr. 6 / <i>Sweet cherry No. 6</i>	16SrI-B pogrupis / <i>sub-group</i>	+
Trešinė Nr. 7 / <i>Sweet cherry No. 7</i>	16SrIII-T pogrupis / <i>sub-group</i>	–
Trešinė Nr. 8 / <i>Sweet cherry No. 8</i>	16SrIII-T pogrupis / <i>sub-group</i>	–
Trešinė Nr. 9 / <i>Sweet cherry No. 9</i>	–	+
Trešinė Nr. 10 / <i>Sweet cherry No. 10</i>	–	+
Trešinė Nr. 11 / <i>Sweet cherry No. 11</i>	16SrIII-T pogrupis / <i>sub-group</i>	–
Trešinė Nr. 13 / <i>Sweet cherry No. 13</i>	16SrI-B pogrupis / <i>sub-group</i>	–
Trešinė Nr. 14 / <i>Sweet cherry No. 14</i>	16SrIII-T pogrupis / <i>sub-group</i>	+
Trešinė Nr. 16 / <i>Sweet cherry No. 16</i>	16SrIII-T pogrupis / <i>sub-group</i>	–
Trešinė Nr. 17 / <i>Sweet cherry No. 17</i>	16SrIII-T pogrupis / <i>sub-group</i>	–
Trešinė Nr. 18 / <i>Sweet cherry No. 18</i>	–	–
Trešinė Nr. 19 / <i>Sweet cherry No. 19</i>	–	–
Trešinė Nr. 20 / <i>Sweet cherry No. 20</i>	–	–
Trešinė Nr. 21 / <i>Sweet cherry No. 21</i>	–	–
Trešinė Nr. 22 / <i>Sweet cherry No. 22</i>	–	–

Fitoplazminė infekcija trešnėse nustatyta pagal 1 200 bp dydžio lizdinio PGR produktą (1 pav.). RFLP ir rDNR sekų analizė parodė, kad trešnėse aptiktos fitoplazmos priklausė dviem grupėms. Nustatytos 6SrIII-T ir 16SrI-B pogrupių fitoplazmos /Valiunas et al., 2009/.



1 paveikslas. PGR produktų elektroforezė agarozės gelyje, kai R16F2n/R16R2 PGR produktai gauti iš trešnių mėginių Nr. 2, 3, 7, 8, 10, 11; M – DNR dydžio žymuo *GeneRulerTM 100 kb DNA Ladder Plus*, K – neigiama vandens kontrolė
Figure 1. Electrophoresis of PCR products in the agarose gel where PCR products of R16F2n/R16R2 were obtained from samples of sweet cherry No. 2, 3, 7, 8, 10, 11; M – DNA marker *GeneRulerTM 100 kb DNA Ladder Plus*, K – negative control of water

Iš lauko atnešti augalai būna užsikrėtę ir grybų sporomis, ir bakterijomis. Nuo šio užsikrėtimo labai priklauso *in vitro* kultūros indukavimas. Visose fitoplazmomis bei viroidais infekuotų augalų grupėse eksplantai iš esmės dažniau žuvo dėl grybinės ir bakterinės infekcijos pirmuoju *in vitro* kultūros indukavimo tarpsniu (2 lentelė). Tose tirtų augalų grupėse, kuriose buvo nustatyti viroidai, indukavimo metu eksplantų žuvinimas dėl grybinės ar bakterinės infekcijos buvo didžiausias ir siekė 100 %. Nepavyko indukuoti *in vitro* kultūros iš augalų Nr. 9 ir Nr. 10, kuriuose buvo nustatyti viroidai. Tiriamų augalų grupėje, kurioje buvo nustatyta fitoplazminė infekcija, sterilios *in vitro* kultūros indukcijos dažnis, nors ir buvo sumažėjęs, palyginti su kontrolinių augalų grupe, bet buvo iš esmės didesnis (14,1 %), palyginti su augalų grupėmis, kuriose buvo aptikti viroidai. Iš šios grupės augalų sterili kultūra indukuota sėkmingiau, kai eksplantai buvo paimti nuo sprogstančių šakelių pavasarį.

Kadangi fitoplazmoms būdinga migracija augalo audiniuose /Wei et al., 2004/, atsiranda galimybė nustatyti augalų organus ir audinius, kuriuose fitoplazmų koncentracija yra mažiausia, dėl to padidėja kultūros *in vitro* indukcijos galimybė. Iširtos įvairaus augumo fitoplazmomis ir viroidais infekuotų augalų šakelių panaudojimo galimybės steriliai kultūrai indukuoti (3 lentelė). Praėjus mėnesiui po pasodinimo, gyvų eksplantų kiekis sumažėjo: paimtų nuo vidutinių ir trumpų šakelių – 2,5, nuo ilgų –

1,4 karto. Nustatytas infekcijos pasireiškimo skirtumas ant eksplantų, paimtų nuo skirtingų šakų. Bakterinės infekcijos registruota 2,8 karto dažniau nei grybinės ant pumpurų, paimtų nuo ilgiausių šakelių, ir 2,4 karto dažniau nei grybinės ant pumpurų, paimtų nuo vidutinių šakelių. Eksplantų, paimtų nuo trumpų šakelių, užsikrėtimas bakterine bei grybine infekcija buvo vienodas ir siekė 43,3 %. Gyvybingi eksplantai dažniausiai buvo paimti nuo ilgiausių šakelių. Kultivuojant toliau, dalis jų žuvo, likusieji pradėjo proliferuoti. Tyrimo duomenys patvirtina, kad proliferuojanti kultūra sėkmingiau indukuojama iš intensyviau augančių augalo vegetatyvinių organų.

2 lentelė. *In vitro* kultūros indukavimo dažnio priklausomumas nuo augalų donorų užsikrėtimo fitoplazmomis ir viroidais

Table 2. *Induction rate of in vitro culture as influenced by plant-donor infection with phytoplasmas and viroids*

Eksplantų donorai <i>Donor of the explants</i>	Pasodinta eksplantų vnt. <i>Explants cultivated, number</i>	Užkrėtų grybine ir bakterine infekcija eksplantų <i>Explants with fungal and bacterial infection %*</i>	Išgyveno iki 5-o subkultivavimo <i>Survived until 5th subcultivation %*</i>	Pasidauginimo koeficientas <i>Coefficient of propagation</i>
Trešnės su fitoplazma <i>Sweet cheery with phytoplasma</i>	234	85,9b	14,1b	2,0
Trešnės su viroidais <i>Sweet cheery with viroids</i>	123	100,0a	0,0c	0,0
Trešnės su fitoplazma ir viroidais / <i>Sweet cheery with phytoplasma and viroids</i>	79	98,7a	1,3c	1,0
Trešnės be fitoplazmos ir viroidų / <i>Sweet cheery without phytoplasma and viroids</i>	82	56,1c	43,9a	2,0

Pastaba / Note. * – ta pačia raide pažymėti dydžiai iš esmės nesiskiria ($R \leq 0,01$) / values marked by the same letter do not differ significantly ($R \leq 0.01$).

Pavasariį trešnių eksplantus pasodinus ant maitinamosios terpės, po dviejų savaičių gyvų liko beveik trečdalis, kontrolinių augalų išgyveno trys ketvirtadaliai eksplantų (3 lentelė). Iš viso nuo bakterinės infekcijos žuvo 3,1 karto daugiau eksplantų nei nuo grybinės, tačiau kai kuriais atvejais buvo daugiau (75 %) žuvusių nuo grybinės infekcijos. Tik šešių (50 %) vaismedžių eksplantai penkis mėnesius išgyveno *in vitro*. Trešnių Nr. 9 bei Nr. 14 visi eksplantai žuvo nuo infekcijos, kaip ir sodinant vasarą. Penkis mėnesius *in vitro* išgyveno 77,8 % kontrolinio medžio eksplantų.

Iš viso per tyrimo laikotarpį iš atrinktų užsikrėtusių augalų į mėgintuvėlius buvo pasodinta 436 eksplantai. Iš jų kultūroje *in vitro* adaptavosi ir pradėjo augti 52 (11,9 %) eksplantai.

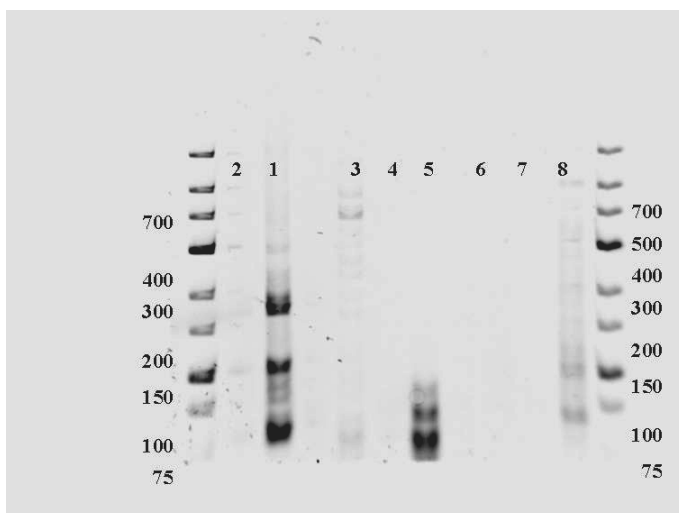
3 lentelė. *In vitro* kultūros indukavimo dažnio priklausomumas nuo eksplantų paėmimo iš fitoplazmomis ir viroidais užsikrėtusių augalų skirtingo ilgio šakelių (suminiai duomenys)

Table 3. *Induction rate of in vitro culture as influenced by different length of branches from which explants were collected from phytoplasma and viroid infected plants (total data)*

Eksplantų grupė <i>Group of explants</i>	Šakelių ilgis <i>Length of branch</i>	Pasodinta eksplantų vnt. <i>Explants cultivated, number</i>	Užkrėtų grybine ir bakterine infekcija eksplantų <i>Explants with fungal and bacte- rial infection %*</i>	Išgyveno iki 5-o subkultivavimo <i>Survived until 5th subcultivation %*</i>
Trešnės su fitoplazma <i>Sweet cheery with phytoplasma</i>	ilgos <i>long</i>	128	89,1c	10,9b
	vidutinės <i>medium</i>	66	84,8c	15,1b
	trumpas <i>short</i>	40	95,0b	5,0c
Trešnės su viroidais <i>Sweet cheery with viroids</i>	ilgos <i>long</i>	52	100,0a	0,0d
	vidutinės <i>medium</i>	8	100,0a	0,0d
	trumpas <i>short</i>	63	100,0a	0,0d
Trešnės su fitoplazma ir viroidais / <i>Sweet cheery with phytoplasma and viroids</i>	ilgos <i>long</i>	43	97,7ab	2,3cd
	vidutinės <i>medium</i>	19	100,0a	0,0d
	trumpas <i>short</i>	17	100,0a	0,0d
Trešnės be fitoplazmos ir viroidų / <i>Sweet cheery without phytoplasma and viroids</i>	ilgos <i>long</i>	9	22,2d	77,8a

Pastaba / *Note.* Paaiškinimai po 2 lentelės / *Explanation under Table 2.*

Praėjus metams nuo eksplantų pasodinimo *in vitro*, įvertintas fitoplazmų ir viroidų paplitimas mikroūgliuose. Tirti visi vaismedžiai, turėję fitoplazmas arba viroidus ir indukavę *in vitro* kultūrą, trešnės Nr. 17, turėjusios 16SrIII-T pogrupio fitoplazmą, ir trešnės Nr. 6, turėjusios viroidą ir 16SrI-B pogrupio fitoplazmą, mikroūgliai. Atlikus analizę, trešnės Nr. 6 mikroūgliuose fitoplazmos buvimas nenustatytas, bet aptiktas viroidas (2 pav.).



2 paveikslas. Elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje rezultatai: 1, 3, 5, 7 – trešnės Nr. 6 mikroūglių RNR, 2, 4, 6, 8 – neigiama vandens kontrolė; 1, 2 – ADFVd specifiniai pradmenys, 166 bp, 3, 4 – AFCVd specifiniai pradmenys, 184 bp, 5, 6 – ASSVd specifiniai pradmenys, 263 bp, 7, 8 – PBCVd specifiniai pradmenys, 170 bp

Figure 2. Results of electrophoresis in a polyacrylamide gel: 1, 3, 5, 7 – RNA of sweet cherry No. 6 microshoots, 2, 4, 6, 8 – negative control of water; 1, 2 – ADFVd-specific primers, 166 bp, 3, 4 – AFCVd-specific primers, 184 bp, 5, 6 – ASSVd-specific primers, 263 bp, 7, 8 – PBCVd-specific primers, 170 bp

Trešnės Nr. 17 tirti mikroūgliai paimti iš visų kultūrą indukavusių pumpurų. Visų pumpurų suformuoti mikroūglių klonai buvo padauginėti skirtinguose indeliuose ir iš kiekvieno jų paimtas ėminys fitoplazmai nustatyti. Fitoplazma aptikta vieninteliame klono Nr. 30-5 mikroūglyje (4 lentelė).

Virusų, viroidų, fitoplazmų kaupimasis augalo vegetatyviniuose organuose lemia jo produktyvumo sumažėjimą, todėl patogenų eliminavimas ir sveikos sodinamosios medžiagos išauginimas yra svarbūs ekonomiškai. Apie viroidų ir fitoplazmų eliminimą iš augalų paskelbta nedaug publikacijų. Jose aprašomas *in vitro* kultūros metodu taikymas kartu su termoterapija, šalčio terapija arba chemoterapija.

Viroidų sukeltamų ligų kontroliavimo būdai labai mažai tyrinėti. Šiuo tikslu žoliniams augalams taikyta termoterapija /Lizarraga et al., 1980/. Tikėtina, kad trešnes infekuojantys viroidai taip pat gali būti eliminuoti meristemų kultūroje taikant termoterapiją ir šalčio terapiją, kaip buvo atlikta su sėklavaisinių augalų viroidais /Postman, Hadidi 1995; Howell et al., 1998/. Tyrimai parodė, kad Lietuvos trešnynuose aptinkami viroidai. Kaulavaisiuose (augalai Nr. 6, 9, 10 ir 14) aptikti labai panašaus dydžio RNR fragmentai. Tai leidžia manyti, kad visi šie medžiai yra užsikrėtę tos pačios grupės viroidais. Taikyti tyrimų metodai neleido tiksliai identifikuoti viroido grupės. Tyrimų metu nustatyta, kad vien tik indukuojant sterilią kultūrą *in vitro* iš trešnių vegetatyvinių audinių negalima pašalinti viroidų. Jų buvimas vegetatyviniuose audiniuose lemia ne tik

sterilios kultūros indukcijos sėkmę, bet ir tolesnę eksplantų proliferaciją. Eksplantų pasidauginimo koeficientas ir gebėjimas adaptuotis *in vitro* kultūroje yra sumažėjęs.

4 lentelė. Fitoplazmos paplitimas trešnės Nr. 17 *in vitro* kultūroje

Table 4. Distribution of phytoplasma in *in vitro* culture of sweet cherry No. 17

Pumpuro Nr. <i>No. of bud</i>	Klono Nr. <i>No. of clone</i>	Fitoplazma <i>Phytoplasma</i>
11	1	–
15	1	–
15	2	–
15	3	–
21	1	–
21	2	–
21	3	–
30	1	–
30	2	–
30	3	–
30	5	16SrIII-T pogrupis / <i>sub-group</i>
33	4	–
114	2	–
114	4	–
114	5	–

Kadangi fitoplazmos yra nekultivuojamos bakterijos, jų tyrinėjimas yra komplikotas. Prieš penkerius metus (2004 m.) pasirodė publikacijų su informacija apie fitoplazmų genomą, fitoplazmos bei augalo šeimininko baltymų sąveiką ir fitoplazmų plazmidės. Fitoplazmos aptiktos atliekant PGR (polimerazinę grandininę reakciją), kurioje su universaliais pradmenimis nuo bendrosios infekuoto augalo DNR pagausinta fitoplazmų 16S rDNR /Lee et al., 1993/. Jos toliau tyrinėjamos atliekant RFLP (restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo) analizę arba sekvenuojant. Pastarąjį dešimtmetį fitoplazmos suklasifikuotos į 30 RFLP grupių ir sudaryta fitoplazmų klasifikacijos schema /Lee et al., 1998; Wei et al., 2008/, pagal kurią galima identifikuoti naujus ir žinomus šio tipo patogenus. Kaulavaisius dažniausiai užkrečia fitoplazmos *Ca. Phytoplasma prunorum* (*European stone fruit yellows* fitoplazma, 16Sr-X grupė) /Davies, Adams, 2000; Pollini et al., 2001/, taip pat *Ca. Phytoplasma ulmi*, *Ca. Phytoplasma asteris* bei 16SrIII grupės fitoplazmoms giminingi fitoplazmų kamienai /Marcone et al., 1996/. Tyrimų rezultatai leido identifikuoti trešnių fitoplazmas, priklausančias dviem skirtingoms grupėms.

Tyrimai parodė, kad *in vitro* kultūros indukavimo sėkmė priklauso nuo augalo donoro užsikrėtimo fitoplazmomis. Tokių augalų eksplantuose žymiai dažniau pasireiškė grybinė ar bakterinė infekcija. Galima teigti, kad fitoplazmų buvimas augale sudaro prielaidas ant jo ūglių tarpai gausesnei išorinei mikroflorai. Daugeliu atvejų eksplantai, izoliuoti vasaros metu, neindukavo *in vitro* proliferuojančios kultūros. Šią procedūrą pakartojus pavasarį, buvo gauti žymiai geresni rezultatai. Tam galėjo turėti įtakos augalo fiziologinė būklė bei fitoplazmų koncentracija, nes įrodyta, kad rudenį, sumedėjusiems augalams pereinant į ramybės būklę, fitoplazmos migruoja iš ūglių į šaknis ir ūgliuose

lieka mažesnė jų koncentracija /Jiang et al., 2004/. Gauti rezultatai parodė, kad *in vitro* kultūrą indukavus iš fitoplazmomis užkrėstų augalų, mikroūgliai dažniausiai esti be fitoplazmų. Likusios fitoplazmos sunkiai plinta *in vitro* kultūroje. Be to, *in vitro* kultūra savaime sukuria medžiagą, kurią tiriant gali būti taikomi visi kiti fitoplazmų eliminavimo metodai.

Išvados

1. Fitoplazma arba viroidais užsikrėtę augalai yra smarkiai pažeisti ir kitų mikroorganizmų (bakterijų bei grybų). *In vitro* kultūros indukcijai geriausiai tinka intensyviausiai augantys ūgliai.
2. Trešnių vaismedžiuose nustatytos 6SrIII-T ir 16SrI-B pogrupių fitoplazmos.
3. *In vitro* kultūra iš dalies eliminuoja fitoplazmas, bet nepašalina viroidų.

Padėka

Tyrimą parėmė Lietuvos valstybinis mokslo ir studijų fondas pagal Pramoninės biotechnologijos plėtros programos projektą „Viroidų ir fitoplazmų detekcija ir pašalinimas iš biotechnologijos pramonei vertingų augalų“ (Nr. N-07010).

Gauta 2009 06 01

Pasirašyta spaudai 2009 07 21

LITERATŪRA

1. Ambrós S., Desvignes J. C., Llácer G., Flores R. Peach latent mosaic viroid and pear blister canker viroids. Detection by molecular hybridization and relationships with specific maladies affecting peach and pear trees // *Acta Horticulturae*. – 1995, vol. 386, p. 515–521
2. Astruc N., Marcos J. F., Macquaire G. et al. Studies on diagnosis of hop stunt viroid in fruit trees: identification of new hosts and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents // *European Journal of Plant Pathology*. – 1996, vol. 102, p. 515–521
3. Chalak L., Elbitar A., Rizk R. et al. Attempts to eliminate *Candidatus phytoplasma phoenicium* from infected Lebanese almond varieties by tissue culture techniques combined or not with thermotherapy // *European Journal of Plant Pathology*. – 2005, vol. 112, p. 85–89
4. Converse R. H., George R. A. Elimination of mycoplasma like organisms in cabot highbush blueberry with high-carbon dioxide thermotherapy // *Plant Disease*. – 1987, vol. 71, No. 1, p. 36–38
5. Dai Q., He F. T., Liu P. Y. Elimination of phytoplasma by stem culture from mulberry plants (*Morus alba*) with dwarf disease // *Plant Pathology*. – 1997, vol. 46, p. 56–61
6. Davies D. L., Adams A. N. European stone fruit yellows phytoplasmas associated with a decline disease of apricot in southern England // *Plant Pathology*. – 2000, vol. 49, p. 635–639
7. Deng S., Hiruki C. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes // *Journal of Microbiological Methods*. – 1991, vol. 14, p. 53–61
8. Desvignes J., Cornaggia D., Grasseau N. et al. Pear blister canker viroid: host range and improved bioassay with two new pear indicators, Fieud 37 and Fieud 110 // *Plant Disease*. – 1999, vol. 83, p. 419–422
9. Faggioli F., Loreti S., Barba M. Occurrence of peach latent mosaic viroid (PLMVd) on plum in Italy // *Plant Disease*. – 1997, vol. 81, p. 423–426

10. Gundersen D. E., Lee J. M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs // *Phytopathologia Mediterranea*. – 1996, vol. 35, p. 144–151
11. Howell W. E., Burgess J., Mink G. I. et al. Elimination of apple fruit and bark deforming agents by heat therapy // *Acta Horticulturae*. – 1998, vol. 472, p. 641–646
12. Jiang H., Wei W., Saiki T. et al. Distribution patterns of mulberry dwarf phytoplasma in reproductive organs, winter buds, and roots of mulberry trees // *Journal of General Plant Pathology*. – 2004, vol. 70, No. 3, p. 168–173
13. Jomantienė R., Davis R. E. Apple sessile leaf: a new disease associated with a *Candidatus Phytoplasma asteris* subgroup 16SrI-B phytoplasma in Lithuania // *Plant Pathology*. – 2005, vol. 54, No. 2, p. 237
14. Kryczynski S., Paduch-Cichal E., Skrzeczkowski L. J. Transmission of three viroids through seed and pollen of tomato plants // *Journal of Phytopathology*. – 1988, vol. 121, p. 51–57
15. Lee I. M., Gundersen-Rindal D. E., Davis R. E., Bartoszyk I. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1998, vol. 48, p. 1153–1169
16. Lee I. M., Hammond R. W., Davis R. E., Gundersen D. E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma like organisms // *Phytopathology*. – 1993, vol. 83, p. 834–842
17. Lizarraga R. E., Salazar L. F., Roca W. M., Schilde-Rentschler L. Elimination of potato spindle tuber viroid by low temperature and meristem culture // *Phytopathology*. – 1980, vol. 70, No. 8, p. 754–755
18. Loreti S., Fagioli R., Barrale R., Barba M. Occurrence of viroids in temperature fruit trees in Italy // *Acta Horticulturae*. – 1998, vol. 472, p. 555–560
19. Marcone C., Ragozzino A., Seemüller E. European stone fruit yellows phytoplasma as the cause of peach vein enlargement and other yellows and decline diseases of stone fruits in southern Italy // *Journal of Phytopathology*. – 1996, vol. 144, p. 559–564
20. Murashige T., Skoog F. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiology Plantarum*. – 1962, vol. 15, p. 473–497
21. Paduch-Cichal E., Kryczynski S. A. Low temperature therapy and meristem-tip culture for eliminating four viroids from infected plants // *Journal of Phytopathology*. – 2008, vol. 118, No. 4, p. 341–346
22. Pallas V., Gomez G., Amari K. et al. Hop stunt viroid in apricot and almond // *Viroids*. – St Paul, USA, 2003, p. 168–170
23. Pfannenstiel M. A., Slack S. A. Response of potato cultivars to infection by the potato spindle tuber viroid // *Phytopathology*. – 1980, vol. 70, p. 922–926
24. Pollini C. P., Bissani R., Giunchedi L. Occurrence of European stone fruit yellows phytoplasma (ESFYP) infection in peach orchards in northern-central Italy // *Journal of Phytopathology*. – 2001, vol. 149, p. 725–30
25. Postman J. D., Hadidi A. Elimination of apple scar skin viroid from pears by in vitro thermo-therapy and apical meristem culture // *Acta Horticulture*. – 1995, vol. 386, p. 536–543
26. Sinclair W. A., Griffiths H. M. Variation in aggressiveness of ash yellows phytoplasmas // *Plant Disease*. – 2000, vol. 84, No. 3, p. 282–287
27. Tarakanovas P. Statistinių duomenų apdorojimo programos paketas *Selekcija*. – Akademija, Kėdainių r., 1999. – 57 p.
28. Urbanavičienė L., Valiūnas D., Jomantienė R. Molecular identification of agents causing Yellows diseases in oats (*Avena sativa* L.) // *Zemdirbyste-Agriculture*. – 2008, vol. 95, No. 3, p. 286–292

29. Valiūnas D., Jomantienė R., Davis R. E. Identification of subgroup 16SrI-B phytoplasma from naturally infected pear in Lithuania // *Sodininkystė ir daržininkystė*. – 2004, t. 23, Nr. 4, p. 29–36

30. Valiūnas D., Jomantiene R., Ivanauskas A. et al. First report of a new phytoplasma subgroup 16SrIII-T, associated with decline disease affecting sweet and sour cherry trees in Lithuania // *Plant Disease*. – 2009, vol. 93, No. 5, p. 550

31. Wei W., Kakizava S., Suzuki S. et al. *In planta* dynamic analysis of onion yellows phytoplasma using localized inoculation by insect transmission // *Phytopathology*. – 2004, vol. 94, No. 3, p. 244–250

32. Wei W., Lee I. M., Davis R. E. et al. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2008, vol. 58, No. 10, p. 2368–2377

ISSN 1392-3196

Zemdirbystė-Agriculture, vol. 96, No. 3 (2009), p. 129–140

UDK 581.2:634.23:578.083

***In vitro* culture of phytoplasma- and viroid- infected sweet cherry (*Prunus avium* L.)**

G. Stanienė¹, V. Stanys¹, J. Vinskienė¹, R. Abraitis²,
R. Jomantienė³, D. Valiūnas³, A. Abraitienė²

¹Lithuanian Institute of Horticulture

²Institute of Biotechnology

³Institute of Botany

Summary

To evaluate the presence of phytoplasma- and viroid- caused infections in Lithuanian sweet cherry orchards and to determine possibilities to induce *in vitro* culture of infected plants as well as to evaluate the extent of culture infection by pathogens under study, plants were inspected in various plantations of Alytus, Kaunas, Šiauliai and Vilnius districts. Branches of 15 visually suffering and 5 symptomless sweet cherry trees were collected. Infected trees were identified by use of molecular techniques and their *in vitro* culture was induced. One year after inducing explant cultivation *in vitro*, phytoplasmal and viroid distribution in microshoots was evaluated and regularity of distribution of phytoplasmas and viroids in *in vitro* culture was determined. The fragments of circular RNA of similar sizes were detected in the samples of the infected trees. RFLP and sequence analyses of 16S rDNA showed that phytoplasmas detected in sweet cherry belong to two phytoplasma subgroups, 16SrIII-T and 16SrI-B of the two phytoplasma groups. It was found that the plants infected with phytoplasmas or viroids were strongly affected by the other micro-organisms (bacteria and fungi) as well. The most intensively growing shoots induced *in vitro* culture best. The results also showed that induction of *in vitro* culture partly eliminated phytoplasmas but, however, did not eliminate viroids. Possibilities to eliminate the pathogens under study by use of *in vitro* culture are discussed.

Key words: phytoplasmas, viroids, *Prunus avium* L., molecular identification, *in vitro*.